

المكتبة الأكاديمية

الفيرويد

والأمراض الفيروسية

الفيرويد

والأمراض الفيرويدية

تأليف الدكتور

محمود موسى أبو عرقوب

أستاذ أمراض النبات بكلية الزراعة جامعة

قاريونس سابقاً



الناشر

المكتبة الأكاديمية

١٩٩٦

حقوق النشر

الطبعة الأولى: حقوق التأليف والطبع والنشر © ١٩٩٦
جميع الحقوق محفوظة للناشر

المكتبة الأكاديمية

١٢١ ش التحرير - الدقي - القاهرة

تليفون: ٢٤٩١٨٩٠ / ٢٤٨٥٢٨٢

تلكس: ABCMN U N ٩٤١٢٤

فاكس: ٢٠٢ - ٢٤٩١٨٩٠

لا يجوز إستنساخ أى جزء من هذا الكتاب أو نقله بأي طريقة كانت إلا بعد
الحصول على تصريح كتابى من الناشر.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

كلمة شكر

بسم الله الرحمن الرحيم والصلاة والسلام على سيدنا محمد وعلى آله وصحبه
أجمعين وبعد: إن من يستحق الشكر دائماً وبدون إنقطاع هو الله سبحانه وتعالى
«رب اوزعني أن أشكر نعمتك التي أنعمت عليّ وعلى والدي» لنعمه التي لا
تحصى ولا تعد «وإن تعدوا نعمة الله لا تحصوها». ولكن جرت عادات البشر أن
يشكر الانسان كل من قدم إليه معروفاً أو أسدى إليه احساناً. إنني أسجد لله شاكراً
العلی العظيم الذى الهمنى الصبر وامدنى بالطاقة ومعونة السفر لاجاز هذا الكتاب.
وحيث أننى سافرت وقابلت كثيراً من الباحثين فى جميع أنحاء العالم وقدموا لى
المساعدة الكبيرة وإننى أشكر هؤلاء العلماء الذين لم ييخلوا علىّ بانتاجهم. إنى
أشكر العلماء الانية اسمائهم لما قدموه لى من أبحاث سواء لهم أو لزملائهم وهم
مرتبين حسب كمية المعطاء الذى قدموه لى وهم:-

عدد الأبحاث المقدمة للمؤلف	البلد	اسم العالم
١٤	اليابان	1 - Yoshimi Okada.
١١	اسبانيا	2 - Ricardo Flores.
٨	استراليا	3 - Mohamed Ali Rezaian.
٨	استراليا	4 - Mark W. Schwinghamer.
٨	اسبانيا	5 - Duran - Vila N.
٦	اسبانيا	6 - Jose Maria Belles.
٥	استراليا	7 - Robert H. Symons.

عدد الأبحاث المقدمة للمؤلف	البلد	اسم العالم
٤	ألمانيا	8 - Detlev Riesner.
٤	بولندا	9 - Elzbieta Paduch - Cichal.
٤	نذرلاند	10 - Harm Huttinga.
٤	بريطانيا	11 - Adams N.A.
٣	اليابان	12 - Satoshi Naito.
٣	البرازيل	13 - Kitajima E.W.
٣	اسرائيل	14 - Moshe Bar - Jseph.
٢	الفلبين	15 - Velasco J.R.
١	اليابان	16 - Yamaya Jun.
١	إيطاليا	17 - Julian chela - Flores.

هذا ولا أنسى أن أقدم شكرى للسيدة الدكتورة ناهد عبد الحميد زاهر فى قسم
الفيرس فى مركز البحوث الزراعية القاهرة.

كما وأنى أشكر الأستاذ أحمد أمين الذى رغب بنشر هذا الكتاب وأشكر
المهندس حمدى قنديل الذى دائماً ما يبذل الجهد الجهد فى إظهار الكتاب فى
أحسن صورة.

«والحمد لله من قبل ومن بعد»

المؤلف الدكتور

محمود موسى أبو عروب

المحتويات

رقم الصفحة	مقدمة
١٩	الجزء الأول
٢٥	الفصل الأول: - تطور علم الفيروسات
٢٧	مقدمة - أدلة وجود الفيروسات - غياب الفيروسات - موقع مسبب المرض في الخلية.
٣٢	تقدير الوزن الجزيئي للفيروسات المعروفة - التنقية.
٣٣ - ٣٦	الصفات الفيزيائية والكيميائية للفيروسات - الوزن الجزيئي للفيروسات
٣٧	الدورة المخزلية في البطاطس.
٣٧	الذئبة الحرارية - الحساسية للإشعاع - الفحص بالميكروسكوب
٣٨ - ٤٠	الإلكتروني.
٤٢	تركيب جزئ الفيروس.
٤٥	الصفات الحيوية - التضاعف (التناسخ) - نشوء المرض - الانتقال.
٤٨ - ٥٨	أصل الفيروسات - تتابع اكتشاف الفيروسات. مراجع مختارة.
٥٩	الفصل الثاني: - الفيروسات وتفاعلاتها مع العائل.
٥٩ - ٦٣	مقدمة - تفاعلات خلية عائل الفيروس - موقع الفيروسات في الخلية - ترجمة الفيروس.
٦٥ - ٧٤	تركيب جزئ الفيروس - مقدمة - التركيب الأولي والثانوي - التركيب الثانوي - التركيب المقطعي.
٧٧	الوزن الجزيئي والشكل.

- تناسخ (تضاعف) الفيروسات - الانزيمات الداخلة في تضاعف الفيروسات - المتنبات. ٨٤ - ٧٩
- المركبات الوسيطة في تناسخ الفيروس. ٨٥
- انشطار بواى الفيروس قليلة الازدواج والتحليق في الفيروسات. ٩٢
- أشكال التناسخ - تناسخ الدائرة الملتفة - الانشطار المتخصص ٩٣ - ١٠٠
- لـ RNA أثناء تناسخ الدائرة الملتفة - تفاعل الانشطار الذاتى لرأس المطرقة في ASBVd - غياب منتجات الترجمة. ١٠٠
- دراسة المرض الفيروى - المصادر - التشخيص - كلونة الجزيء - ١٠٠
- التنقية. ١٠٥
- ميكانيكية نشوء المرض (المرضية). ١٠٧
- مقارنة بين الفيروسات وبعض الكائنات الأخرى - الفيروسات ١١٢
- والفيروسات - الفيروسات والفيروسات. ١١٣
- ماذا عن الفيروسات الحيوانية. ١١٥
- فرضية العالم Diner: هل الفيروسات مستحاثات جزئ من عالم RNA. ١١٧
- تقرير العالم Flores - الآراء المعارضة لنظرية Diener. ١١٨ - ١٢٠
- مراجع مختارة. ١٢٤
- الفصل الثالث - الدراسات الحديثة للفيروسات** ١٢٧
- أولاً: تصنيف الفيروسات - فيروسات مجموعة PSTVd - مميزات مجموعة ASBVd. ١٣٣
- ثانياً: النطاقات - نموذج النطاق لمجموعة PSTVd - نموذج النطاق لـ B₁ من PSTVd. ١٣٥
- لتحت مجموعة B₁ من PSTVd. ١٣٨
- نطاق P, C - نطاق P فى فيروس CEVd يلعب دوراً فى المرضية - نطاق V - نطاق T - نطاق C فى مجموعة PSTVd - الدور المقترح فى إعادة تنظيم النطاقات ١٤٦ - ١٤٩

	فى نشوء الفيروسات - الدليل المباشر على إعادة الاتحاد فى RNA بين الـ RNAs الفيروية - تنابع النطاقيات فى الفيروسات والفيروسات يدل على النشوء بواسطة إعادة ترتيب RNA.
١٥٤ - ١٤٩	ثالثاً: - اختلاف التتابع فى تنوعات التتابع فى الفيروسات - مقدمة
١٦١ - ١٥٦	تنوعات التتابع فى ASBVd - تنوعات التتابع فى مجموعة PSTVd - تنوعات التتابع فى CEVd تنوعات التتابع فى HSVd - تنوعات التتابع فى فيروسات أخرى.
١٩٧ - ١٦٣	رابعاً: - تشخيص الفيروسات - مقدمة - الإختبارات الحيوية - الهجرة الكهربائية فى البولى اكريلاميد جيل - الهجرة الكهربائية ثنائية الاتجاه - التهجين الجزيئى - طريقة Dot Blot - hybridization - التعرف على الفيروسات باستعمال منقبات مشعة - التعرف على الفيروسات باستعمال منقبات غير مشعة - معلمه بالبيوتين - معلمه بالداى جوزجنين، معلمه بالكيماريات المتألقة - الاتجاهات المستقبلية لتكنولوجيا المنقب - التزايد العدى الانزيمى للحمض النووى الهدف - اكتشاف الحمض النووى الهدف بطريقة ماندوتش هايريدانيزشن
٢٠٠ - ١٩٧	مراجع مختارة
٢٠٠	
٢٠٣	الفصل الرابع: - دراسات تطبيقية على الفيروسات
٢١٦ - ٢٠٣	أولاً: - بناء فيروس معدى فى المعمل - بناء فيروس CEVd فى المعمل - النسخ فى المعمل - تخوير خمسة فتحة الطرفية وتحليق نسخ RNA - توضيح لبناء الفيروسات فى المعمل - بناء الأشكال المستقيمة والدائرية من فيروس اكسوكورتز الحمضيات - حيوية فيروس اكسوكورتز الحمضيات المصنع فى المعمل - تأثير تخوير النهاية الطرفية خمسة فتحة على حيوية النسخة المستقيمة
٢٢٠ - ٢١٦	مناقشة النتائج

ثانياً: - المعالجة بالحرارة المنخفضة ومزرعة القمة الرستمية لاستبعاد ٢٢٠ - ٢٢٥ أربعة فيروسات من النباتات المصابة - مقدمة - نتائج البحث
ثالثاً: تثبيط إصابة الفيروس بواسطة تعبيرات RNA مضاد المعنى فى ٢٢٦ - ٢٤٥ النباتات المحولة وراثياً - مقدمة - استعمال RNA مضاد المعنى مع الفيروسات - نتائج البحث - تحليل المركب المتكون من RNA مضاد المعنى و RNA الهدف فى المعمل
تعبيرات RNA مضاد المعنى فى نباتات البطاطس المحولة وراثياً - تثبيط الإصابة الفيروسية فى النباتات المحولة وراثياً - مناقشة النتائج

رابعاً: الوقاية بالتضاد بين أربعة فيروسات - نبات الاقحوان - ٢٤٩ - ٢٥٩ الاختبارات على نباتات الطماطم - الاختبارات على نباتات الاقحوان - نتائج الاختبارات - نتائج على الطماطم نتائج الاختبارات على الاقحوان - ادخال فيروس ثمره الخيار الباهتة فى التجربة.

خامساً: التداخل بين الفيروسات المحقونة معاً - الجرعة المطلوبة ٢٦٣ - ٢٦٩ لتعبيرات الأعراض - تثبيط تناسخ فيروس تقزم حشيشة الدينار بعد الحقن المشترك بفيروس PSTVd

مراجع مختارة ٢٧٠ - ٢٧١

الجزء الثانى : الأمراض الفيروسية

الفصل الخامس: الأمراض الفيروسية المنتسبة عن ٢٧٣
مجموعة PSTVd. ٢٧٣ - ٢٨٤

فيروسات من تحت مجموعة PSTVd B₁.
فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس - مرض الدرنه المغزلية فى البطاطس - الأعراض - الكائن الممرض - أشكال الفيروس حركة المسبب فى النبات - هل الفيروس يسير خلال اللحاء تأثير المسبب على التكاثر الجنى والانتقال خلال البذور

- مرض ككسيا في الحمضيات - مقدمة - الأعراض - إنتقال ٣٤٧ - ٣٥٢
المرض - مسبب المرض - تأثير درجات الحرارة على فيروس ككسيا.
- فيروسات نخيل جوز الهند - مرض كادانج - كادانج في ٣٥٤ - ٣٦٩
نخيل جوز الهند - مقدمة - أعراض مرض كادانج - كادانج - أصل وانتشار مرض كادانج - كادانج - الخسائر الاقتصادية - مسبب المرض - أشكال فيروس CCCVd - إنتقال مرض كادانج - كادانج والمدى العائلي للفيروس - المدى العائلي - صفات فيروسات كادانج - كادانج. تنوعات ccRNA البطيء ووقت حدوث الإصابة - طرق عزل ودراسة فيروس كادانج - كادانج.
- مرض تنانجافا في جوز الهند - مسبب المرض. ٣٧٤ - ٣٧٧
- فيروسات الاقحوان - مرض تقزم الاقحوان - مقدمة - ٣٧٨ - ٣٩٦
الأعراض - الكائن الممرض - الأعراض التشريحية - تشريح النباتات المحقونة بالفيروس CSVd - الساق - القمة المرستمية الأوراق - استعمال فيروس CSVd في تقليل الإصابة ببيكتريا العفن الطرى - العلاقة بين الفيروس الموجود في النبات وخفض تحلل النخاع بالبكتريا - إعادة إكتشاف البكتيريا من العقل المحقونة - الاختبارات الهستولوجية - هل هذه الظاهرة وقاية بالتضاد - مرض الشحوب المتبع في الاقحوان - الأعراض - المسبب. ٣٩٦ - ٣٩٩
- فيروسات حشيشة الدينار - مرض تقزم حشيشة الدينار - ٤٠٠ - ٤٠٨
مقدمة عن نبات حشيشة الدينار - مرض تقزم حشيشة الدينار - مسبب المرض - العوامل المشخصة - التخلص من الفيروس - سلالات الفيروس.

الفيرويد الكامن في حشيشة الدينار - الأعراض غير المنظورة ٤١٣ - ٤١٦
الفيرويد.

فيرويدات الطماطم - مرض النبات الذكري في الطماطم - ٤١٧ - ٤٢٧
مقدمة - الأعراض - المسبب - إنتشار الفيرويد في النباتات
المصابة - الوقاية بالتضاد - العوامل الطبيعية للفيرويد - إنتقال
الفيرويد.

مرض تقزم قمة الطماطم - مرض القمة الشجرية في ٤٢٧ - ٤٣١
الطماطم - مقدمة - الأعراض - المسبب - المميزات العامة
للمسبب.

فيرويد الخيار - مرض الثمرة الباهتة في الخيار - أعراض ٤٣٦ - ٤٤٠
المرض - المسبب - إنتقال الفيرويد - المدى العائلي.

فيرويدات كوليومينا - فيرويد كوليومينا الكامن - مقدمة - ٤٤٠ - ٤٤٦
الفيرويد - فيرويد نيماتنص - مقدمة - الأعراض - الفيرويد
- إنتقال الفيرويد - تداخل الفيرويد والوقاية بالتضاد - تماثل
تتابع الفيرويد مع الفيرويدات الأخرى.

الفصل السادس: - فيروسات تحت مجموعة B₂ و B₃. ٤٤٧

فيرويدات تحت مجموعة B₂.

فيرويدات التفاح - مقدمة - مرض ندب الجلد في التفاح - ٤٤٧ - ٤٦٢
الأعراض على الثمار - الأعراض على المجموع الخضري -
تأثير الحرارة والفترة الضوئية على حدوث وتكشف الأعراض
- تأثير الحرارة وفترة الاضاءة على معيار الفيرويد في أشجار
التفاح - تأثير نوع النسيج على معيار الفيرويد - مرض تنقر
التفاح - مسبب المرض - اكتشاف الفيرويد ASSVd
و DAVd في مكونات البذرة والبراعم.

مرض تغضن ثمرة التفاح.

فيرويدات الكمثرى - مرض البثرة المتفرحة في الكمثرى - ٤٦٢ - ٤٧٠

مقدمة - أعراض المرض - مسبب المرض - مقارنة
فيروس PBCVd مع فيروسات أخرى - الصفات العامة
للفيروس.

٤٧١ - ٤٩٥ فيروسات العنب - مقدمة - فيروس العنب عزلة فيروس تقزم
حشيشة الدينار - فيروس العنب عزلة فيروس اكسوكورتز
الحمضيات - اكتشاف الفيروس - فيروس العنب الاسترالي -
مقدمة - تنابع النيوكليوتيدات الكامل للفيروس AGVd -
تركيب النطاقيات في الفيروس AGVd - نطاقيات المرضية
والاطراف - مقارنة الفيروس AGVd مع الفيروسات الأخرى
- فيروسات النقطة الصفراء في العنب - مقدمة - فيروس
النقطة الصفراء في العنب رقم ١ - صفات الفيروس -
مطابقة الفيروس مع نموذج نطاقيات الفيروسات - فيروس
النقطة الصفراء في العنب رقم ٢ - مقارنة بين فيروس النقطة
الصفراء في العنب رقم ١ ورقم ٢ - تعبيرات الأعراض.
٤٩٦ - ٥٠٢ فيروسات تحت مجموعة B3.

فيروسات الكوليس - مقدمة - فيروس اصفرار الكوليس -
مقدمة - إنتقال الفيروس - طبيعة الفيروس - فيروس كوليس
بليومي رقم ١.

٥٠٣ - ٥٢٩ الفصل السابع: - فيروسات مجموعة A.

تحت مجموعة ASBVd - مرض ضربة الشمس في
الافوكادو - مقدمة - الأعراض - تعاقب تكشف الأعراض
بعد الحقن بأنسجة مصابة بضربة الشمس - مسبب المرض
- فيروس ضربة الشمس في الافوكادو - تمايز أعراض
المجموع الخضري في الافوكادو المصاب - اكتشاف الفيروس
في النسيج المصاب - تنوعات فيروس ضربة الشمس في
الافوكادو - اكتشاف فيروس ضربة الشمس في الافوكادو

في البلاستيدات الخضراء فى الأوراق - هل بكتيريا البناء	
الضوئى همزة وصل بين الفيرويدات والنباتات - طريقة	
الكشف عن مكان تواجد الفيرويد - ملخص أبحاث	
العالم Semancik عن فيرويد ضربة الشمس فى الافوكادو.	
فيرويدات الخوخ - مرض اللوزايك الكامن فى الخوخ -	٥٣٠ - ٥٤٦
مقدمة - الأعراض - المسبب - تتابع النيوكليوتيدات فى	
فيرويد PLMVd - التركيب الثانوى المقترح - تركيب رأس	
المطرقة للفيرويد - موقع الفيرويد بين الفيرويدات	
والفيروسايدات - الصفات العامة للفيرويد - مرض تنقر ثمار	
الوخوخ والبرقوق - مقدمة - مسبب المرض - الصفات العامة	
للعزلات المسببة للأمراض.	
فيرويدات نخعت الدواة.	٥٤٧ - ٥٥٥
فيرويد تقزم الدخان البرى - مقدمة - الأعراض - المدى	٥٤٧ - ٥٥٠
العائلى للفيرويد.	
فيرويد تقزم القرنفل - مقدمة - الأعراض - الكائن المسبب	٥٥٠ - ٥٥٣
- العزلة الاسبانية.	
فيرويد لفحة أوراق القمح.	٥٥٣ - ٥٥٤
فيرويد اللجستروم.	٥٥٤
فيرويد الاصفرار المحيت فى نخيل الزيت.	٥٥٤
فيرويد اللوزايك المبرقش فى البسلة الهندية.	٥٥٤
فيرويد تقزم الارقطيون	٥٥٥
المراجع: كتب	٥٥٧
مجلات وأبحاث	٥٥٩

مقدمة

بسم الله الذى علم الانسان ما لم يعلم، لقد ترددت كثيراً فى ولوج هذا المدخل حين فكرت فى اصدار كتاب فى موضوع الفيرويدات وإتباتتى هواجس كثيرة وذلك لأن هذا العلم صعب وحديث وإن الناقلين موجودون بالمرصاد لكل محاولة فى مجال جديد. زيادة على ذلك لا يوجد أى كتاب أو نشرة باللغة العربية تتكلم فى هذا الموضوع وخفت أن أنزلق فى مسالك الهلاك وخاصة حتى تخوض فى هذا العلم يجب أن تكون ملماً بكثير من العلوم مثل الكيمياء الحيوية والجزيئية والهندسة الوراثية وأمراض النبات.

وبعد أن استخرت الله سبحانه وتعالى إنقشعت عن ذهنى هذه المخاوف واختمرت هذه الفكرة فى خيالى وبدأت السفر والترحال وأقلب وجهى فى مشارق الدنيا ومغاربها حتى أستطيع الحصول من العلماء والباحثين على أحدث الأبحاث وأشملها لكى أقدم كتاباً فيه شئ مما يصبو إليه القارئ العربى والمتخصص فى علم أمراض النبات. عقدت العزم وتوكلت على الله وبدأت أبحث وأنقب عن مراكز أبحاث الفيرويد والعلماء وأقابلهم أو أتصل بهم حتى استطعت أن احصل على ما يقارب من ثمانين بحثاً ثم اكملت ذلك من المكتبات وجمعت معظم إن لم يكن كل ما كتب عن الفيرويد باللغة الانجليزية (هناك أبحاثاً كثيرة باللغة اليابانية والصينية والاطالية) من سنة ١٩٧١ حتى ١٩٩٤ ونقلته باختصار شديد ولاقيت معاناة كبيرة فى التعامل مع الكم والكيف لهذه الابحاث وخاصة الاصطلاحات العلمية ونقلت كل ذلك فى صورة مبسطة فى هذا الكتاب.

إن أولى المشكلات التي قابلتني في تحضير هذا الكتاب هي المصطلحات العلمية الخاصة بالهندسة الوراثية والكيمياء الجزيئية، وهذه الشكوى مكررة في كل ما كتبت من كتب قبل هذا الكتاب ولإني أطلب من مجمع اللغة العربية أن يضعوا لنا حلاً لهذه المشكلة، وإلا بقينا نقدم رجلاً ونؤخر أخرى في تأليف وترجمة الكتب العلمية الحديثة. ونحن الآن نعتمد على اجتهادات خاصة في تفسير المصطلحات العلمية قد تكون مناسبة وقد لا تكون ولكن هذه هي الحلول الموجودة.

تعتبر الفيرويدات كائنات صغيرة (كلمة كائن باللغة العربية الفصحى تعنى شئ موجود وهي مشتقة من الكينونة وليست مقتصرة على الحي أو غير الحي) جداً تقاس بالنانوميتر (واحد على بليون من المتر) وطولها يساوى ٥٠ نانوميتر ووزنها الجزيئى صغير جداً يساوى $\frac{1}{1000}$ من الوزن الجزيئى لاصغر فيروس. يتركب الفيرويد من حمض نووى RNA احادى الخيط وتأخذ الشكل الدائرى أو المستقيم شبه العصى وقد تتفرع احياناً أو يتكون بها تركيب دبوس الشعر أو تركيب رأس المطرقة، وكل ذلك فى اوضاع وظروف معينة مشروحة فى الكتاب بالتفصيل. يتركب الفيرويد من نيوكليتييدات حوالى ٢٤٦ لاصغر فيرويد و ٣٧٥ لأكبر فيرويد ولا نستطيع الجزم بهذه الأرقام لأن العلم كل يوم يأتى بجديد (بعض الباحثين قال إن بعض الفيرويدات يتركب من ٦٠٠ نيوكليتيده وهو بذلك وقع فى خطأ علمى (وما أكثر الأخطاء العلمية فى الفيرويدات) لأنه وجد جزيئين من الفيرويد كل منها ٣٠٠ نيوكليتيده مرتبطان مع بعضهما البعض).

نسب الفيرويدات امراضاً على النباتات الزهرية ولم يظهر حتى سنة ١٩٩٤ أنها تصيب النباتات غير الزهرية أو الحيوانات ولكن كما قلنا فإن العلم كل يوم يأتى بجديد. إن كثيراً من الأمراض التي كانت تعتبر أمراض فيروسية قد إنسخلت عن قسم الأمراض الفيروسية وأصبحت منضمة فى أعداد الأمراض الفيرويدية بعد أن تأكد عدم صحة التشخيص الأول لهذه المسببات. سوف لا يمضى طويل وقت حتى تصبح قائمة الأمراض الفيروسية المتحولة إلى الأمراض الفيرويدية طويلة جداً.

إن سبب هذا التحول هو التقدم العلمى الهائل الذى حصل فى الكيمياء الجزيئية والهندسة الوراثية وطرق الفصل والتحليل التى تطبق على الحمض النووى RNA.

قبل السبعينات من هذا القرن لم يكن للفيروسات أى ذكر ولم تكن قد عرفت، إلا أن العالم T.O.Diener بأبحاثه المستمرة على مرض الدرة المغزلية فى البطاطس استطاع أن يكتشف أن مسبب المرض ليس فيروس وإنما كائن قريب الشبه بالفيروس وسماه فيروس ذلك سنة ١٩٧١. ثم بعد ذلك إنتشرت الأبحاث على هذه الكائنات وبعد ستة عشر عاماً يعنى سنة ١٩٨٧ أمكن اكتشاف عشرة فيروسات ودراستها دراسة وافية ثم بعد ذلك استمرت اكتشافات الفيروسات ولغاية سنة ١٩٩٤ أمكن اكتشاف ما يربو على ٣٠ فيروس. يعتبر فيروس الدرة المغزلية فى البطاطس هو أكثر الفيروسات التى نالت قسطاً وافراً من الدراسة، وجميع أسس علم الفيروسات أخذت من نتائج الدراسة على فيروس الدرة المغزلية. كذلك فإن العالم Diener هو أكثر العلماء أبحاثاً على الفيروس.

نستطيع أن نقول إن علم الفيروس قد ولد وشب وأبغى فى فترة قياسية من الزمن أو يمكن القول بأنه ولد يافعاً وذلك لأنه فى فترة ربع قرن تقريباً حدث له تقدم سريع يقابل ما حصل لعلم الفيروس فى أكثر من ثمانين سنة تقريباً وذلك يعود للتقدم السريع فى الكيمياء الجزيئية والهندسة الوراثية.

إن طرق العزل الحديثة وطريقة PAGE وما حدث لها من تحورات وتطورات كبيرة ساعدت كثيراً فى اكتشاف الفيروس وتقديره فى مستخلصات النبات. إن هذه الطريقة أمكن بواسطتها اكتشاف الفيروس بكمية قليلة جداً تقدر باليكو غرام وهذا الوزن يساوى واحد من بليون (مليون مليون) غرام. زيادة على ذلك فإن طرق استعمال المنقبات والبودئ والحمض النووى المكمل والكلونة، أمكن بواسطتها السير بخطى سريعة فى مجال الفيروس حتى أصبح علم الفيروس من العلوم الشائعة فى جميع أقسام أمراض النبات وأقسام الأحماض النووية فى معظم أنحاء العالم.

إن هذا الكتاب الذى بين أيدينا يقع فى جزئين، الجزء الأول يتكلم عن

الفيرويدات بشكل عال ويتكون من أربعة فصول، الفصل الأول يتكلم عن الفيرويد من حيث تطور علم الفيرويد وأدلة وجود الفيرويد وجميع صفات الفيرويد. أما الفصل الثانى يتكلم عن الفيرويدات وتفاعلاتها مع العائل ومقارنة الفيرويدات مع الفيروسات والفيروسايدات. أما الفصل الثالث فيتكلم عن الدراسات الحديثة للفيرويدات من حيث النطاقات واختلاف التتابع فى تنوعات الفيرويدات وتشخيص الفيرويدات. أما الفصل الرابع يتكلم عن الدراسات التطبيقية فى علم الفيرويدات من حيث بناء فيرويد معدى أو المعالجة بالحرارة المنخفضة أو تثبيط الإصابة الفيرويدية أو الوقاية بالتضاد والتداخل بين الفيرويدات المحقونة معاً.

أما الجزء الثانى من الكتاب فيتكلم عن الأمراض الفيرويدية. يتكلم عن المرض المتسبب عن الفيرويد وأعراض المرض واسم الفيرويد المسبب وصفاته وطرق الانتقال. وقد قسمت هذا الجزء إلى ثلاثة فصول الفصل الخامس يتكلم عن الأمراض المتسببة عن فيرويدات تحت المجموعة B₁ الذى يمثلها فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس. أما الفصل السادس يتكلم عن فيرويدات تحت مجموعة B₂ و B₃. وحيث أن فيرويدات مجموعة A تحتوى على فيرويديين فقط فإنى جعلتها فى آخر الكتاب فى الفصل السابع.

هناك بعض الفيرويدات لا تزال تحت الأبحاث أو فى بداية الاكتشاف وهذه الفيرويدات وضعتها فى آخر الكتاب حتى تتم الفائدة، وعن كل فيرويد كتبت المرجع الذى أخذ منه هذا البحث ولم أكتب هذا المرجع فى المراجع العامة. إنى كتبت مراجع هذه الفيرويدات الحديثة معها فى نفس الصفحة حتى يتأكد القارئ أن كل ما فى هذا الكتاب يمكن الرجوع إليه والاستزادة منه.

أما بالنسبة للمراجع فى الجزء الأول كتبت فى نهاية كل فصل عدة مراجع خاصة جداً بهذا الفصل حتى يمكن الرجوع إليها أما فى نهاية الكتاب فكتبت حوالى ٢٩٠ مرجع سواء كتب أو مجلات وهذه المراجع التى كتبتها يمكن الرجوع إليها فى المكتبات العربية أما المراجع المنشورة ولا تصل إلى الدول العربية فإنى لم أكتبها فى المراجع. وقد رتبت المراجع بطريقة حديثة وذلك حسب حداثة المرجع

وذلك لسهولة الرجوع إليها فوضعت مراجع سنة ١٩٩٤ لوجدها وسنة ١٩٩٣ لوجدها وهكذا وضمن هذه السنوات رتب مراجع حسب الطريقة التقليدية.

فى هذا الكتاب يشعر القارئ فى كل فقرة أو موضوع أنه أمام تجربة أو بحث أو أنه يقرأ تفاصيل البحث والتجربة وكتب تفاصيل بعض التجارب حتى يكون القارئ ملماً بالنتائج وطرق الوصول إليها. وهذه الطريقة فى كتابة الكتب العربية نادرة جداً إلا أنها شائعة ومنتشرة فى كثير من الكتب الأجنبية خاصة فى الأمراض البكتيرية والفيروسية. حاولت تطبيق هذه الطريقة فى هذا الكتاب حتى يخرج عن قضية سرد المعلومات مباشرة إلى قضية كيفية إجراء التجارب والحصول على النتائج. قد يكون هذا الأسلوب مستحباً عن النظام القديم حيث أننى قدمت للباحث منهلاً عذباً يستقى منه مباشرة طرق إجراء التجارب ومناقشة النتائج وسهولة الرجوع إلى المراجع العلمية. واستطيع أن أقول بأن كل فكرة فى هذا الكتاب هى نتيجة تجربة علمية قام بها دارس أو باحث.

وحتى يستطيع القارئ أن يستفيد من هذا الكتاب يجب أن يكون ملماً بالكيمياء الحيوية والجزيئية والهندسة الوراثية وأمراض النبات.

وأنا إذ أقدم هذا الكتاب للباحثين أو الدارسين أسجد لله شكراً الذى الهمنى الصبر وامدنى بالقوة حتى يخرج هذا الكتاب فى هذه الحالة التى هو عليها. وأقدم أسفى واعتذارى عن كل خطأ فى هذا الكتاب لأن الكمال لله سبحانه وتعالى

«ولله الحمد من قبل ومن بعد»

المؤلف الدكتور / محمود موسى أبو عرقوب

الأول من ربيع الآخر سنة ١٤١٦ هجرية

الموافق ٢٧ أغسطس سنة ١٩٩٥م

٢٧ آب سنة ١٩٩٥م

الجزء الأول

الفيرويدات
VIROIDS

الفصل الأول

تطور علم الفيروس

مقدمة:

إن اصطلاح فيروس *Viroid* إستعمل ليدل على مجموعة من المسببات المرضية الجديدة والمميزة والتي هي أصغر من الفيروس *Subviral*. تتكون الفيروسات المعروفة من وحدة قصيرة من سلسلة الحمض النووي RNA ذات وزن جزيئي يقارب ٧٥ - ١٠٠ ألف دالتون. عند دخول هذه الوحدات من RNA ذات الوزن الجزيئي المنخفض في عوائل قابلة للإصابة يحدث لها تضاعف بشكل واضح وتسبب امراضاً في العائل.

لقد ذكر اول إستعمال لكلمة فيروس سنة ١٩٧١ وذلك أثناء المحاولات التي كانت تجرى لتتقيد ومعرفة صفات العامل المسبب لمرض الدرنه المغزلية في البطاطس والذي كان يعتقد خطأ بأنه يتسبب عن فيروس. ففي سنة ١٩٦٧ ذكر كلاً من Diener & Raymer أن المسبب للمعدى لهذا المرض هو عبارة عن خيط حر من الحمض النووي RNA وأن هذه الأجزاء الفيروسية (حسب ذلك الاعتقاد) يبدو أنها لا تتواجد في النسيج المصاب. وبعد فترة من الزمن وعند إستعمال طرق الترسيب والتحليل بالزل الكهربائي في الجيل، فإنه تقرر وبشكل قاطع وحاسم أن هذا الحمض المعدى من آل RNA له وزن جزيئي صغير جداً، وبالتالي فإن هذا العامل المسبب للمرض يختلف وبشكل أساسي عن الفيروسات المتعارف عليها.

بعد أن تأكد بأن مرض الدرنه المغزليه فى البطاطس يتسبب عن عامل يختلف عن الفيروس ولكن كان فيه إلتباس مع الفيروس أطلق عليه العالم Diener اسم فيروس د (قريباً من لفظ فيروس). ثم بعد ذلك تبين فى سنة ١٩٧٢ و ١٩٧٣ أن هناك امراضاً أخرى مثل تقزم الاقحوان Chrysanthemum stunt ومرض اكسوكورتز الحمضيات Citrus exocortis تسبب عن الحمض النووى RNA ذو وزن جزيئى منخفض وسميت المسببات لتلك الأمراض فيروسات.

أدلة وجود الفيروسات Evidence For Existance of Virods.

١. الصفات الترسيبية والحساسية لأنزيم نيوكلييز:

لقد أظهرت الأبحاث المبكرة التى أجريت على المستخلص الخام من أوراق البطاطس أو الطماطم المصابة بمرض الدرنه المغزليه، أن معظم المواد المعدية تترسب على معدل بطئ جداً (Ca 10S) وأن هذه الصفة جعلت الباحثين أن يقرروا بشكل قاطع بأنه من غير المحتمل أن تكون المواد المعدية والموجودة فى العصير الخام هى أجزاء فيروس وكذلك وجد أن هذه المواد غير حساسة للمعاملة بالمذيبات العضوية المختلفة. إن جزيئات الفيروس محتوية على دهون وذات الكثافة المنخفضة يبدو أنها غير واردة. كذلك فإن معاملة المستخلصات الخام بالفينول لا تؤثر على حيوية ولاالصفات الترسيبية لهذا العامل الممرض. واعتماداً على هذه النتائج إفترض أن هذه العوامل المسببة للمرض هى حمض نووى حر.

وجد أن تخضين المستخلص الخام مع أنزيمات النيوكلييز Nucleases أظهر أن هذه العوامل المسببة للمرض حساسة لأنزيم Ribonuclease وغير حساسة لأنزيم De + oxyribonuclease. إن الملاحظات التى استنتجت من أن العامل الممرضى يمكن تركيزه وسهولة ترسيبه بالايثانول واعادل تعليقه Resuspension فى حجم صغير من منظم يكون متوافقاً مع فكرة أن هذا العامل الممرض هو حمض نووى حر.

وكذلك وجد أن تخضين المستخلصات مع أنزيم Ribonuclease فى بيئة ذات تركيز أيونى عال أظهرت أن هذا العامل الممرض يبقى حياً إلى حد ما بهذه المعاملة. إن هذه الصفة بالإضافة إلى صفة الغسل أو الإزالة من أعمدة Methylated serum albumin تؤدي إلى الاقتراح بأن هذا العامل الممرض المستخلص قد يكون خيط مزدوج من الحمض RNA.

لقد إستخلص كل من Singh & Bagnall حمض نووى معدى من نسيج مصاب بفيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس وقارنا بعض صفات هذا الحمض مع صفات الحمض النووى الموجود فى العصارة الخام فى المستخلص، فوجدنا أن العامل الممرض فى العصارة الخام (الحمض النووى RNA) له قدرة على أحداث المرض على درجة عالية من التخفيف وله درجة تثبيط عالية وكان أكثر حساسية لأنزيم Ribonuclease، عند إزالة حيوية العصارة الخام باستعمال درجة حرارة عالية أو التخضين مع أنزيم Ribonuclease يمكن أن تسترجع هذه الحيوية بالمعاملة بالفينول. وبالدراسات التى أجريت باستعمال الطرد المركزى، تبين للباحثين أنه لا يوجد حمض نووى RNA ممرض حر فى العصارة الخام ولكنهما لم يبينا مع أية مادة كان مرتبطاً.

لقد ذكرت نتائج مشابهة لتلك التى ذكرها Diener & Raymer وذلك من قبل Semancik & Weathers سنة ١٩٦٨ عندما كانا يعملان على مرض اكسوكورتز الحمضيات. وجد الباحثان أن معظم المادة الحيوية تكون موجودة فى العصارة المنقاة والمخضرة من النسيج المصاب تبقى فى المادة الطافية فى المحلول بعد إجراء عملية الطرد المركزى عالية السرعة. من هذا استنتج الباحثان أن المادة المعدية المرضية تمتلك كفاءة ترسيب حوالى ١٠ - ٥١٥. بسبب هذه النتائج وبسبب عدم إمكانية ملاحظة أجزاء فيروسية نموذجية كاملة بواسطة التصوير بالميكروسكوب الالكترونى، فقد إقترح الباحثان أن الفيروس يمكن أن يمثل شكل من أشكال الحمض النووى المعدى، قد تكون هذه الأشكال مشابهة إما لشكل غير

ثابت من فيروس خشخشة الدخان، طفرات غير متجمعة لفيرس موزايك الدخان أو كمجزي حمض نووي RNA مزدوج السلسلة.

أما الكائن الممرض الثالث الذى درس فى تلك الفترة فهو مسبب مرض تقزم الاقحوان، حيث قام بدراسته Lawson سنة ١٩٦٨ وقد ذكر الباحث أن هذا المسبب يمتلك صفات إلى حد ما مشابهة لتلك التى يتصف بها مسبب مرض الدرنه المغزلية فى البطاطس ومسبب اكسوكورتز الحمضيات. وقد تميز مسبب تقزم الاقحوان بزيادة طول المادة المعدية والمسببة للمرض والتى تكورت أثناء عملية الطرد المركزى عالية السرعة. تبين أن الكائن المسبب للمرض حساس للمعاملة بأنزيم Ribonuclease ويمكن تركيزه بالتريسيب بالايثانول المتبوع بإعادة التعليق. إن معاملة مثل هذه التحضيرات المركزة بالفينول يؤدي إلى ظهور عينات ذات حيوية مشابهة لتلك العينات غير المعاملة.

٢ - غياب الفيرونات : Absence of Virions

مع أن هناك قليل من الشك بأن التريسيب البطي لهذه المواد المعدية فى التحضيرات المأخوذة من الأنسجة المصابة بمرض الدرنه المغزلية فى البطاطس، اكسوكورتز الحمضيات وتقزم الاقحوان تكون خالية من جزيئات الحمض النووى RNA الحر، فإن السؤال الذى يخطر على البال هو هل توجد هذه الكائنات المعدية بذاتها فى مكان فى الخلية أم أنها تنطلق من أجزاء الفيروس العادى أثناء الاستخلاص^{٢٩}. وللإجابة على هذا السؤال فقد درس مرض الدرنه المغزلية فى البطاطس بأسهاب كبير، فقد قرر العالم Diener سنة ١٩٧١ أن الصفات التريسيبية للمواد المعدية (سرعة التريسيب) التى توجد فى المستخلصات الخام (والتي من المحتمل أن تتكون من فايروونات) لم تتغير معنوياً بمعاملة المستخلصات الخام بالفينول فقط أو بالفينول فى وجود مركب Sodium dodecyl sulfate. هذه النتائج أدت إلى القول بعدم احتمالية أن يكون RNA مرتبطاً مع بروتين أو أن يكون موجوداً بشكل فيرون كامل أو فيروونات محطمة جزئياً. لقد تأكدت هذه النتائج عن طريق

ملاحظة أن التحضيرات النقية جداً من RNA المأخوذة من نسيج مصاب بمرض الدرنه المغزلية تحتوي أيضاً مواد معدنية والتي ترسب بمعدلات أسرع من تلك المتوقع الحصول عليها من RNA حر. وإذا كانت هذه المواد المعدنية سريعة الترسب مكونة من أجزاء من بروتين نووي فيروسي فإن هذه الأجزاء يمكن أن تكون بالتالي ذات صفات غير عادية. من هذه الصفات أن غلافها البروتيني يجب أن يكون فضفاضاً بشكل كبير وكاف ليسمح بوصول أنزيم Ribonuclease (نظراً لأن نشاط وحيوية هذه المواد تكون حساسة للمعاملة بهذا الأنزيم). علاوة على ذلك وبعض من الصفات الأخرى، فإن هذه التركيبات يمكن أن تكون مقاومة للمعاملة بالفينول ومركب Sodium dodecyl sulfate.

نظراً لعدم وجود (التأكد من وجود) بروتينات نووية في هذه الجزيئات فإن العالم Diener سنة ١٩٧١ إستنتج أن هذه المواد المعدنية ذات سرعة الترسب العالية لا يوجد فيها بروتين نووي فيروسي وبالتالي ليست أجزاء فيروسية. لقد تأكدت هذه الاستنتاجات السابقة تأكيداً جديداً بملاحظة (تجارب في الموضوع In situ) أن مسبب مرض الدرنه المغزلية في البطاطس يكون حساساً للمعاملة بأنزيم Ribonuclease. وجد أن الترشيع بالتفريغ Vacuum in filtration لمصارة الأوراق المصابة بمسبب مرض الدرنه المغزلية في البطاطس والموجود فيها أنزيم Ribonuclease يؤدي إلى الفقد الكلي إلى حد ما في نشاط وحيوية هذا المسبب، في حين أنه تحت هذه الظروف لا تتأثر حيوية ونشاط جزيئات الفيروس العادي.

قام العالم Zaitlin سنة ١٩٧٢ بتجربة حلل فيها بروتينات معزولة من أوراق مصابة بمسبب مرض الدرنه المغزلية في البطاطس وأوراق مصابة بفيروس موزايك الدخان، وقارن ذلك مع بروتينات معزولة من أوراق غير مصابة فوجد أنه لا دليل على وجود بروتينات في الأوراق المصابة بمرض الدرنه المغزلية تعتبر كغطاء بروتيني لمسبب المرض في حين أنه تحت هذه الظروف يتكون الغطاء البروتيني لسلالات فيروس موزايك الدخان ويكون واضحاً تماماً.

تسأل الباحث إذا كان الحمض النووي RNA فى المواد المعدية والتى هى سريعة الترسيب لا يقع تحت مجموعة الفيروسات فماذا عساه أن يكون؟؟ بالنظر إلى صفة سرعة التفكك بالفينول، فمن الصعوبة الاعتقاد أن معدل سرعة الترسيب لبعض المواد المعدية يكون راجعاً إلى ترافقها مع بروتين، والأكثر احتمالاً هو أن RNA يكون مرتبطاً مع مكونات خلوية فى معقدات والتى لا تتحطم بالفينول، أو أنها تتواجد فى مجموعات ذات أحجام مختلفة. وبالتالي يجب التقدم خطوة أخرى فى التعرف على هذا المسبب وذلك بتحديد موقع المسبب المرضى بالنسبة للخلايا المصابة.

٣ - موقع مسبب المرض فى الخلية Subcellular Location :

أجريت إختبارات حيوية على مكونات الخلية من النسيج المصاب بمرض الدرنه المغزلية فى البطاطس أظهرت أن هناك حيوية يمكن تقديرها موجودة فقط فى أجزاء من حطام الخلايا وفى الأجزاء المحتوية على الأنوية. أما البلاستيدات، الميتوكوندريا، الرايبوسومات والأجزاء الذائبة فإنها لا تحتوى إلا على آثار بسيطة جداً من الحيوية (المسبب). زيادة على ذلك عندما عزل الكروماتين من النسيج المصاب كانت هناك حيوية أكثر (وجود مسبب المرض) مرافقة لهذا الكروماتين ويمكن استخلاص مسبب المرض من هذا الكروماتين بمنظم فسفاتى وتبين أنه RNA حر.

إن هذه التجربة وتجارب أخرى أدت إلى القول بأن مسبب مرض الدرنه المغزلية فى البطاطس يكون مترافقاً مع الأنوية وبشكل خاص مع الكروماتين فى الأنسجة المصابة. وجد أن المقدار المعنوى لحيوية المسبب تكون موجودة بانتظام فى حطام النسيج المحتوى على الأنوية، أما عن احتمال وجود بعض جزيئات المسبب مترافقاً مع الأغشية الخلوية لا يمكن القول بأنها تأخذ صفة اللزوم لغاية سنة ١٩٧٢.

نظراً لأن المسبب المرضى لمرض الدرنه المغزلية فى البطاطس يكون مترافقاً مع الكروماتين، هذا يمكن أن يوضح صفاته الترسيبية المتغايرة فى المستخلص الخام.

بالإضافة لوجود جزيئات من مسبب المرض حرة، إلا أن الغالبية العظمى من جزيئات مسبب المرض تكون مترافقة مع أجزاء الكروماتين ذات الأحجام المختلفة. وأن هذه الأجزاء قد تكون هي المسبب الرئيسى لصفات الترسيب السريعة للمواد المعدية المرضية.

أما التجارب التي أجريت على مسبب مرض اكسوكورتز الحمضيات أظهرت أن الحمض النووي RNA المعدى (المسبب للمرض) يكون مشابهاً لما سبقه من حيث الموقع، إذ أنه يوجد في أنوية الخلايا المصابة ويكون وجوده مترافقاً تماماً مع الكروماتين، هذا ما قرره Sanger سنة ١٩٧٢.

٤ - تقدير الوزن الجزيئى للفيروسات المعروفة:

Molecular Weight Estimates of Native Viroids

في أواخر الستينات أجريت محاولات كثيرة لتحديد الصفات الفيزيائية والكيميائية للفيروسات، إلا أن هذه المحاولات وقفت أمامها عوائق كثيرة أهمها (في تلك الفترة) أن الأحماض النووية RNAs يمكن تمييزها فقط بواسطة نشاطها الحيوى وليس اعتماداً على صفاتها الفيزيائية. إنعكست هذه العوائق بشكل خاص وبشدة على الجهود التي بذلت في تحديد الوزن الجزيئى للأحماض النووية.

مع أنه قد عرف لبعض الوقت أن فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس يترسب بمعدل منخفض أقل من جزيئات الحمض النووى الفيروسى RNA وحيد الخيط، إلا أن هذه الملاحظة لم يمكن الاستفادة منها فى تحديد الوزن الجزيئى للفيروس وذلك نظراً لأن التكوين البنائى لهذا الحمض لم يكن معروفاً.

لقد إستعمل العالم Loening سنة ١٩٦٧ طريقة متطورة واعتمد عليها فى امكانية تقدير الوزن الجزيئى، هذه الطريقة مبنية على النشاط الحيوى فقط. لقد إقتنع هذا العالم بأن تأثيرات التركيب الثانوى لهذا الحمض RNA على صفاته الترسيبية تكون متعكسة مع تأثيراتها على حركتها فى الهجرة الكهربائية فى

مركب Polyacrylamide gels وبالتالي فإن دمج هاتين الطريقتين (الهجرة الكهربائية وسرعة الترسيب) سيكون ذو فائدة في تمييز الاختلافات في التركيب نتيجة للاختلافات في الأوزان الجزيئية للأحماض RNAs. وذكر أنه مع أى من هذه الطرق فإن النشاط الحيوى هو المقياس الوحيد الضروري لتقدير النتائج.

إن تطبيق هذا المبدأ على فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس أدى إلى استنتاجات غير متوقعة حيث تبين أن الحمض RNA المسبب للمرض له وزن جزيئى منخفض جداً وكان هذا التقدير حوالى 5×10^4 دالتون فى نتائج معظم التجارب. هناك تأكيدات أخرى ظهرت بشكل أوضح تؤيد الوزن الجزيئى المنخفض لهذا الفيرويد، أمكن الحصول عليها من ملاحظة أن الحمض النووى RNA له القدرة على الدخول فى الجيل Gels ذو التركيز العالى من أل Polyacrylamide (يعنى ثقبوب صغيرة الحجم) والتي لا تستطيع أن تمر منها الأحماض النووية ذات الوزن الجزيئى المرتفع. فى مثل هذا الجيل فإن فيرويد الدرنه المغزلية يتحرك كحرمة متماثلة محددة جيداً بمعدل هجرة يتفق مع الوزن الجزيئى المقدر سابقاً وهذا ما تم تقريره بواسطة العالم Diener سنة ١٩٧١.

أما كلاً من العالم Singh & Clark سنة ١٩٧١ فقد ذكرا بعض النتائج التى أظهرت أيضاً أن فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس هو عبارة عن RNA ذو وزن جزيئى منخفض واستنتاجا من تحديد حركة الفيرويد فى الهجرة الكهربائية فى Polyacrylamide gel ٧,٥% أن قمة الحيوية والنشاط للفيرويد تكون متوافقة مع حجم الجزيئات ذات ٤ - ٥ وحدة من وحدات Svedberg.

لقد ذكر العالم Diener سنة ١٩٧٣ أن الفيرويد المسبب لمرض تقزم الاقحوان هو أيضاً حمض نووى RNA ذو وزن جزيئى منخفض، وقد استعمل فى تجاربه على هذا المرض تنقية جزيئية أكثر تطوراً عن التنقية التى استعملت فى دراسة فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس، وكانت هذه التنقية متبوعة بالترسيب والتحليل بالهجرة الكهربائية. وجد أن RNA المعدى يترسب بمعدلات تتوافق مع القيم 5 - 7.5 S، وأن عمود الهجرة الكهربائية لفيرويد تقزم الاقحوان وفيرويد الدرنه

المغزلية فى البطاطس فى ٧٠٪ polyacrylamide gels أظهرت أن الحمض النووى RNA يهاجر فى مثل هذا الجيل ويتحرك خلاله كحزمة متناسقة محددة تماماً بمعدل هجرة أكثر منه لمسبب الدرنه المغزلية فى البطاطس.

أما بالنسبة لفيروس اكسوكورتز الحمضيات فإن الهجرة الكهربائية للتحضيرات المعدية فى ال polyacrylamide gels تدل على أن الوزن الجزيئى للحمض النووى RNA لمسبب هذا المرض هو ١,٢٥ × ١٠^٥ دالتون وإقترح أن إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية لمكوناته تتناسب مع الانتشار فى الجيل وهذا ما وجدته Semancik سنة ١٩٧٢.

كذلك فإن العالم Sanger سنة ١٩٧٢ وجد فى أبحاثه على فيروس اكسوكورتز الحمضيات باستعمال polyacrylamide gels أن الوزن الجزيئى للحمض النووى RNA لمسبب هذا المرض هو ٥ - ٦ × ١٠^٤ دالتون.

مما تقدم تبين أن الفيروسات المعروفة حتى ذلك الوقت سنة ١٩٧٢ عبارة عن حمض نووى RNA ذو وزن جزيئى منخفض، إلا أن هناك إنتقادات كثيرة وجهت لطريقة حساب الوزن الجزيئى لهذه الفيروسات أهم هذه الإنتقادات هى:-

١ - كانت جميع التقديرات مبنية على حركة الإنتشار الكهربائى فى polyacrylamide gels لجزيئات الحمض النووى RNA المعروفة فى ذلك الوقت، ومقارنة هذه الحركة مع RNA قياسى معروف وزنه الجزيئى. وبالتالي فإنه كلما كان الحمض النووى الفيروى قريب الشبه فى التركيب مع الحمض النووى القياسى كلما كانت النتائج أكثر دقة والعكس صحيح.

٢ - إن نتائج الدراسات التى أجريت على فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس أدت إلى الاقتراح بأن RNA الفيروى قد يتواجد فى تجمعات بحالات عديدة وبالتالي فإن الوزن الجزيئى المقاس بهذه الطريقة قد يكون مبنياً على هذه التجمعات وليس على الخيط المفرد الوحيد من RNA.

٣ - يختلف الوزن الجزيئى المقاس بهذه الطريقة وذلك حسب تركيز الجيل (له تأثير على حجم الثقوب) فوجد مثلاً أنه إذا كان تركيز الجيل أقل من ٨ - ١٠ ٪ فإن RNA موضوع الدراسة يكون ذو وزن جزيئى 1×10^6 دالتون، بينما إذا كان التركيز للجيل أكبر من ٨ - ١٠ ٪ فإن الوزن الجزيئى لنفس الحمض موضوع الدراسة يكون 5×10^4 دالتون.

ونقدم الأبحاث أمكن التغلب على مثل هذه الانتقادات كما سيذكر فى الفصول القادمة إن شاء الله.

• . التنقية Purification :

حيث أن هذه الأشياء (الفيرويدات) مجهولة وفى بداية دراستها، أصبح من الواضح أن التقدم المستمر فى معرفة صفات الفيرويدات يتطلب عزلها وتحضيرها بشكل نقى ثم يتبع ذلك تحليلات بيوكيميائية وبيوفيزيائية عادية.

إن الخطوة الأولى التى تستعمل فى تنقية فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس كما ذكرها Diener سنة ١٩٧٢، عبارة عن الحصول على الأحماض النووية من كميات كبيرة نسبياً من الأوراق المصابة والسليمة. بعد استبعاد كل من ال DNA ، rRNA ، tRNA والسكريات العديدة، فإن العينات المتبقية تحلل بواسطة الفصل الكهربائى فى الجيل Gels electrophoresis .

لقد ظهر فى الإختبارات الحيوية للشرائح المفردة من الجيل أن حيوية الفيرويد متوافقة مع هذا المكون الموجود فى الشريحة. هذا التوافق (المستوى العال من الحيوية) بالإضافة إلى أن هذه المادة لا تتواجد فى تحضيرات الأوراق السليمة، هذا يشكل دليلاً قوياً على أن هذه المادة الموجودة فى شرائح الجيل هى المكون الأصلى لفيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس.

أما بالنسبة لفيرويد اكسوكورنز الحمضيات فقد ذكر العالم Semancik ومساعدوه سنة ١٩٧٢ وسنة ١٩٧٣ أن امتصاص الأشعة فوق البنفسجية يكون

من قبل مواد موجودة فى تحضيرات من أوراق مصابة (وإن هذه المواد غير موجودة فى التحضيرات المأخوذة من الأوراق السليمة) وأن هذه المواد يمكن تعريفها بواسطة الهجرة الكهربائية فى الجيل. إن الانحراف عن هذا التوافق (قمة منحى الامتصاص وقمة الإنتشار النشط فى الجيل) ظهر فى هذه التجربة ولكن هذه الانحرافات عزيت إلى الصعوبات التقنية (التقنية) الداخلة فى تقطيع وقراءة الجيل أثناء التجربة.

إن تنقية فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس بكميات كافية لكى يجرى عليها التحليلات الكيموحيوية والفيزيوكيوية حصل عليها عن طريق إخضاع التحضيرات النباتية إلى الهجرة الكهربائية فى ٢٠٪ polyacrylamide gels (مع إطالة وقت الجريان للتأكد من الفصل الكامل للحمض RNA من المكونات الطبيعية للعائل) مع إزالة أجزاء الجيل المحتوية على فيروس الدرنه المغزلية واسترداد الحمض RNA من شرائح الجيل باستعمال طريقة Diener سنة ١٩٧٣ الداخلة فيها الكروماتوغرافى Hydroxyapatite chromatography ثم رجها مع ميثوكسى إيثانول.

باستعمال التحليل بالهجرة الكهربائية للتحضيرات النهائية وجد أن هناك مكوناً واحداً فقط يمتص الأشعة فوق البنفسجية، وأن هذا المكون له نفس الحركة فى الهجرة الكهربائية مثل فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس الموجود فى تحضيرات أقل تنقية، وأن هذه المادة الممتصة للأشعة فوق البنفسجية تتوافق مع نشاط الإنتشار فى الجيل.

الصفات الفيزيائية والكيميائية للفيروس

Physical and Chemical Properties of Viroeids

١ - الوزن الجزيئى لفيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس:

Molecular Weight of PSTVd

عند توفر التحضيرات النقية من فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس، فإن تحديد الوزن الجزيئى لهذا الفيروس يكون مبنياً على، ليس على نشاطه البيولوجى، بل على

إمتصاصه للأشعة فوق البنفسجية وأصبحت هذه الطريقة ممكنة. ولتحديد الوزن الجزيئى للفيرويد، فقد ذكر العالم Boedtker سنة ١٩٧١ طريقة لذلك وقد إختار هذه الطريقة لأنها تسمح بتحديد الوزن الجزيئى للأحماض النووية RNAs بشكل منفصل عن تركيبها (ثنائى أو ثلاثى)، وبهذه الطريقة فإن الأحماض النووية RNAs يجرى لها دنتره denatured بمادة الفورمالدهيد ثم تقارن حركتها النسبية فى الانتشار الكهربائى مع حركة أجزاء مشابهة لها من حمض نووى RNA مدنتر وقياسى ومعروف وزنه الجزيئى.

لقد تم تطبيق هذه القاعدة على فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس باستعمال RNA المدنتر فى كل من الفيرس المرافق للتبقع الحلقي فى الدخان، المحول، الرايبوسوم، 5S، وفيرس تبرقش القرنفل كأوزان جزيئية قياسية، كانت النتيجة أن الوزن الجزيئى لفيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس يقع فى مجال (٨,٥ × ١٠^٦ دالتون وهذا ما ذكره Diener سنة ١٩٧٣ .

إن هذا التعارض الواضح بين هذه القيمة للوزن الجزيئى والقيمة السابقة التى ذكرت بأنها ٥ × ١٠^٦ دالتون يكون أكثر احتمالاً إلى التركيب المدمج (منضغط) للحمض النووى RNA ويوضح الخطأ الحقيقى الملازم للمحاولات التى أجريت لتقدير الوزن الجزيئى للفيرويدات بالهجرة الكهربائية فى الجيل بالمقارنة للجزيئات المعروفة.

٢ - الدنترة الحرارية لفيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس:

Thermal Denaturation of PSTVd

لتحديد فيما إذا كان فيرويد الدرنه المغزلية احدى أو ثنائى الخيط، درست الدنترة الحرارية للحمض النووى RNA وكان منحنى الدنترة يدل على أن تركيب الفيرويد ليس مزدوج القواعد بانتظام مثل RNA مزدوج الخيط، وبالتالي فإنه فى هذه الحالة

فمن المتوقع أن تحدث الدنترة على معدل درجات حرارة أكثر تقارباً وذات قيمة عالية. وعلى أية حال فإن منحنى الدنترة لا يقرر بأن جزيء RNA احدى الخيط ذو قواعد مزدوجة بدون إنتظام مثل RNA لـحول الذى فيه مناطق احادية الخيط تتبادل مع مناطق مزدوجة الخيط.

إن تحديد صفات الدنترة الحرارية لفيروس الدنترة المغزلية فى البطاطس المذاب فى منظم قوى عالى الايونية ($0.1 \times \text{SSC}$) قد أكد الاستنتاجات السابقة وهى أن الدنترة تحدث على معدل عال من درجات الحرارة. ولقد وجد Diener سنة ١٩٧٣ أنه تحت هذه الظروف فإن درجة حرارة الدنترة تقارب 54°C .

٣ - الحساسية للإشعاع Radiation Sensitivity :

بعد أن تبين أن فيروس الدنترة المغزلية ذو وزن جزيئى منخفض، كان هناك اهتماماً فى تحديد حساسيته للإشعاع بواسطة الأشعة فوق البنفسجية، مع أن الباحث يمكن أن يتوقع أن الوزن الجزيئى المنخفض (كما فى هذا الفيروس) سيكون أكثر حساسية للإشعاع بواسطة الأشعة فوق البنفسجية من الأحماض RNA أو DNA الفيروسية ذات الحجم الأكبر بشكل واضح، إلا أن تأثير الحجم على الحساسية بالأشعة فوق البنفسجية فى الأحماض النووية لم يتوضح تماماً حتى سنة ١٩٧٠.

إن تعريض الحمض النووى RNA الموجود فى كل من فيروس الدنترة المغزلية، فيروس البقعة الحلقية فى الدخان والفيروسات المرافقة، للأشعة فوق البنفسجية ٢٥٤ نانومتر أظهر أن التثبيت حصل بنسبة ٧٠ - ٩٠ ضعف فى فيروس الدنترة المغزلية والفيروسات المرافقة بالمقارنة مع فيروس البقعة الحلقية فى الدخان، هذا ما وجدته Diener سنة ١٩٧٤. هذه النتائج ذات الاختلاف الواضح فى الحساسية للإشعاع بالأشعة فوق البنفسجية يكون تفسيرها بسبب الحجم الصغير للحمض RNA فى

فيرويد الدرنه المغزلية والفيروسات المرافقة إذا ما قورنت بحجم RNA فى فيروس البقعة الحلقية فى الدخان.

لقد قام العالم Semancik سنة ١٩٧٣ بتعميرى تحضيرات من فيرويد اكسوكورتز الحمضيات وفيروس موزايك الدخان إلى أشعة مؤينة، وحدد بالمعدلات المقارنة للتشبيط البيولوجى، الوزن الجزيئى فوجد أنه 1.1×10^6 دالتون للحجم المحدد من فيرويد اكسوكورتز الحمضيات.

٤ - الفحص بالميكروسكوب الالكترونى لفيرويد الدرنه المغزلية :

Electron Microscopy of PSTVD

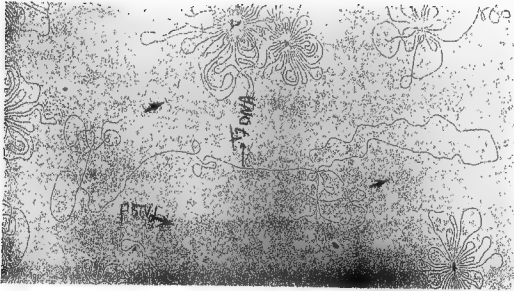
إستعمل العالم Sogo ومرافقوه سنة ١٩٧٣ طريقة لدراسة فيرويد الدرنه المغزلية بالميكروسكوب الالكترونى، فقد عامل تحضيرات نقيه من فيرويد الدرنه المغزلية بطبقة احادية من البروتين واستعمل الطريقة التى ذكرها Zahn و Kleinschmidt سنة ١٩٥٩.

عند رش تحضيرات من فيرويد الدرنه المغزلية الموجودة فى ٤ مول من محلول أسيتات الصوديوم على الصورة تحت المائية للماء المقطر، تكشف تراكيبات قصيرة جداً غالباً فى تجمعات منضغطة ولكن احياناً على شكل أجزاء منفصلة، هذه الأجزاء لم يمكن اكتشافها فى حالة الكنترول لأحماض نووية حرة وكانت غير موجودة فى التحضيرات المعاملة بأنزيم Ribonuclease.

بسبب إتحاد جزيئات فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس فى تجمعات كان من الصعب وضع تصورات عن طول وتركيب الجزيء، بناء على ذلك فإن الطرق التى يكون بمقدورها تفكيك التجمعات وتجعل هناك امكانية رؤية جزيئات فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس بمفرده قد وضعت تحت الإختبار. وبالفعل كان هناك اعداداً كثيرة من السلاسل القصيرة ذات طول متناسق نسبياً لوحظت عندما نشرت تحضيرات من فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس فى محلول يوريا ٨ مول، هذا ماوجده Sogo ومرافقوه سنة ١٩٧٣. لم يمكن تمييز وملاحظة مثل تلك

السلاسل فى عينات الكنترول أو بعد المعاملة بأنزيم Ribonuclease . كان متوسط الطول لهذه الجزيئات حوالى ٥٠٠ أنجستروم.

نظراً لأن الكتلة لكل وحدة طول غير معروفة، فإن أطوال جزيئات فيروس الدرة المغزلية للبطاطس كانت تقارن مع تلك الجزيئات من الأحماض النووية معروفة الوزن الجزيئى التى كانت تضاف إلى مخضيرات الفيروس وكانت عندئذ تعامل بالتطابق بين المعلوم والمجهول.



شكل رقم ١ :

صورة الكترونية لفيروس PSTVd مختلفاً مع DNA ثنائى الخيط و DNA للفاج T₇ بالمقارنة النسبية يلاحظ الحجم الصغير جداً للفيروس بالمقارنة مع DNA للفاج.

يظهر شكل ١ صورة ميكروسكوبية لمخلوط من حمض DNA ثنائي الخيط، Coliphage T₇ و RNA لفيريود الدرة المغزلية في البطاطس. تدل القياسات أن DNA للفاج T-7 حوالى ٢٨٠ ضعف طول فيريود الدرة المغزلية في البطاطس، يظهر كذلك أن سمك فيريود الدرة المغزلية مشابهاً لسمك DNA للفاج T-7. واعتماداً على أن الوزن الجزيئى للحمض DNA - T₇ يساوى ٢٥ × ٦١٠ دالتون كما ذكر العالم Lang سنة ١٩٧٠ فإن الوزن الجزيئى لفيريود الدرة المغزلية هو ٨,٩ × ١٠^٤ دالتون.

إن الفحص الميكروسكوبى لخليط من فيريود الدرة المغزلية وحمض RNA لفيرس تبرقش القرنفل مدنتر بالفورمالدهيد أظهر أن RNA الفيرويدي أسمك من الخيط المفرد من RNA الفيروسي، إلا أن طول RNA الفيروسي حوالى ١٧ ضعف طول RNA الفيرويدي المدنتر. هذه المقارنة أدت إلى تقدير الوزن الجزيئى للفيريود بحوالى ٧,٩ × ١٠^٤ دالتون.

إن تقديرات الوزن الجزيئى (للفيريود) المتحصل عليها بواسطة الميكروسكوب الالكترونى تكون بالتالى متوافقة تماماً مع القيم المتحصل عليها من تحليل الفيريود المدنتر بالحرارة أو بالفورمالين والمستعمل فى polyacrylamide gels.

٥ - تركيب جزئى الفيريود Molecular Srtucture of Viroid

مع أن الوزن الجزيئى المنخفض للفيريودات قد تحدد نهائياً، إلا أن الاختلاف فيما يتعلق بالتركيب الدقيق لجزيئاتها لم يكن واضحاً بشكل جيد فى ضوء المعلومات فى أوائل السبعينات. فى بعض الأنظمة التحليلية فإن الفيرويدات تظهر صفات نموذجية لصفات الحمض RNA ثنائى الخيط، وفى أنظمة أخرى تظهر صفات RNA أحادى الخيط.

إن نظام الازالة المتبع مع فيريود الدرة المغزلية من أعمدة Methylated serum al-bumin أدت إلى القول بأن حمض ال RNA الفيرويدي هو ثنائى الخيط، بينما

طرق الازالة من أعمدة CF - II cellulose أظهرت بأن الحمض RNA يتألف من جزيئات ثنائية السلسلة وجزيئات أحادية السلسلة. إن هذه النتائج المتضاربة قدم لها العالم Engelhardt سنة ١٩٧٢ تفسيراً وذلك بأن أظهر أن إمتداد أو طول التركيب الثانوى للحمض RNA تمتلك تأثيراً عميقاً على طرق لإزالته من مثل هذه الأعمدة. لقد وجد أنه كلما زادت كمية التركيبات الثانوية للحمض RNA فى وقت الاضافة للعمود، كلما زادت القطع أو الأجزاء التى سوف تزال فى منظم Bthanol - free هذه تعنى أن الازالة التى كانت تحدث أولاً كانت تؤدى إلى الاعتقاد بأنه يتكون من حمض RNA ثنائى السلسلة فقط. بالاحتكام إلى هذا المعيار فإن فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس له تركيبات ثانوية عديدة.

من ناحية أخرى فإن إستعمال Hydroxyapatite فإن فيروس الدرنه المغزلية يزال غالباً بمنظم فسفاتي تركيزه أكثر إنخفاضاً من ما هو متوقع لو كان الحمض ثنائى السلسلة. كما أن بعض الأجزاء من الفيروس تزال على تركيزات أعلى من المنظم.

أما إختبارات المناعة التى أجريت مع السيرم المضاد الذى يتفاعل بشكل خاص مع RNA ثنائى السلسلة لم يعط أية دلالة لوجود RNA ثنائى السلسلة فى التحضيرات عالية الإصابة من الفيروس. إن الدترة بالحرارة، الفيروس المعامل بالفورمالين، على أية حال، كان يتبين أنه يتكون من مركبين لهما حركة مختلفة إلى حد ما فى الهجرة الكهربائية.

أما فيما يتعلق بفيروس اكسوكورتز الحمضيات فإن العالمان Semancik & Weathers سنة ١٩٧٠ ذكروا بأن الحمض النووى RNA الممدى يتواجد على شكلين. الشكل الأول يترسب فى مجال (10 - 15S) أما الشكل الثانى يترسب فوق S25. وجد أن ازالة فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس وفيروس اكسوكورتز الحمضيات من أعمدة Methylated serum albumin يكون فى مجال لإزالة الحمض DNA من العائل ولكن لا يشابههما عند الازالة من أعمدة سليولوزية باستعمال منظم إيثانول حر فقط. مع أن هذه الصفات منسجمة مع صفات

الحمض ثنائى السلسلة، إلا أن هناك محاولات أجريت لتفكيك هذا الحمض RNA المتوقع أنه ثنائى السلسلة أو ملاحظة أية مقاومة يديها لأنزيم Ribonuclease فى وسط أيونى عال، وكل هذه المحاولات لم تنجح. أخيراً إتجه الباحثون إلى عملية فصل السلاسل بالحرارة وسرعة التبريد، وخلصوا إلى نتيجة بأن RNA مقاوم جزئياً عند تحضينه مع مادة Diethylpyrophosphate عندئذ ظهرت نتائج مشابهة لفيروس الدرنه المغزلية والتي ذكرها Sing & Clark سنة ١٩٧١ واقترحوا بأن تركيب RNA الفيروى هو على الأقل ثنائى السلسلة جزئياً. أما بالنسبة لفيروس اكسوكورتز الحمضيات تثبط كلية بمادة الفورمالدهيد.

عند مقارنة RNA الفيروى مع RNA الفيروسى وحيد السلسلة، تبين أن فيروس اكسوكورتز الحمضيات مقاوم للتشيط بالحرارة وبأنزيمات القطع الخارجى Exonucleases وفى هذه الصفة الأخيرة يشارك RNA الفيروى للحمضيات فيروس الدرنه المغزلية، إلا أن المقاومة للتشيط بأنزيمات اكسوكورتز أنزيمات القطع الخارجى Exonucleases قد تؤدي إلى القول بأن تركيب RNA الفيروى يكون دائرياً، وهذا ما قرره Diener سنة ١٩٧١ والعالم Semancik سنة ١٩٧٠، إلا أن درجة المقاومة هذه أدت إلى زيادة الأبحاث فى هذا المجال.

واعتماداً على مبدأ الكثافة المنخفضة والتي تجعل الحمض النووى RNA الفيروى عائماً فى محلول متدرج الكثافة من محلول كبريتات السيزيوم القياسى، فإن بعض العلماء اقترحوا أن فيروس اكسوكورتز الحمضيات إما أن يكون حمض نووى منخفض الوزن الجزيئى أو RNA ناقل يشبه mRNA أو جزئ هجين- RNA DNA، ولكن تبين لهم فيما بعد أن مدة الترسيب غير كافية للحصول على أحماض نووية متوازنة منخفضة الوزن الجزيئى من RNA.

وبكلمة موجزة يمكن تلخيص أبحاث العلماء على تركيب جزئ الفيروى بأنه
أما: -

- ١ - أن يكون عبارة عن حمض نووى احادى السلسلة من RNA مع وجود بعض التركيبات مثل تركيب دىوس الشعر تكون ذات قواعد مزدوجة.

٢ - أن يكون الفيروس حمض نووي RNA ثنائي السلسلة ولكن بجزيئات غير كاملة ازدواج القواعد.

الصفات الحيوية

BIOLOGICAL PROPERTIES

١ - المتضاعف (التناسخ) Replication

إن إنخفاض الوزن الجزيئي للفيروسات آثار تساؤلاً، وهو إلى أى مدى تستطيع هذه الأحماض النووية RNAs أن تمتلك معلومات وراثية كافية لتحث على تضاعفها في العوائل القابلة للإصابة. إن الوزن الجزيئي لفيروس الدرنه المغزلية يكون كافياً فقط لعمل شفرة لـ ٧٠ - ٨٠ حمض أميني، هذا يعني أنه لا يكاد يستطيع أن يشفر إلا لمقدار صغير من البروتين، ولكن لا يستطيع أن يشفر إلى تحت وحدة خاصة لعمل أنزيم RNA - polymerase (للتضاعف) بحجم يمكن مقارنته مع تلك الوحدات المعروفة في التضاعف.

وعلى كل حال فإن ما يمكن تصوره هو أن فيروس الدرنه المغزلية ليس نوعاً من الجزيئات المفردة ولكن إلى حد ما عبارة عن تجمعات من جزيئات RNA عديدة متشابهة في الطول بترتيب نيوكليوتيدات مختلف والتي مع بعضها يمكن أن تشكل جينوم فيروسى بحجم عادى تقريباً. هناك بعض إنتقادات وجهت إلى هذا الرأى.

ربما يكون بناء الفيروسات بطاقة عادية من جينوم العائل والتي تبدأ نشاطها بوجود الفيروس في العائل، إلا أنها تكون مكتوبة كلية في النباتات غير المصابة. إذا كان ذلك صحيحاً فإن الفيروسات تعمل كمائنات كبت لهذه الطاقة الكامنة، إما مباشرة أو عن طريق ببتيدات عديدة مترجمة من الحمض النووي RNA. إن مثل هذا التصور يجلب سؤالاً هو لماذا قطع حمض ال DNA المكتوبة كلية والتي تخوى معلومات وراثية غير مرغوبة للكائن الحي يجب أن يحافظ عليها أثناء النمو والتطور؟ أيضاً فإن الباحث يجب أن يتوقع أن الكبح الذاتي لقطع حمض

ال DNA أحياناً يمكن أن تحدث. وهذه الأسئلة بقيت بدون جواب حتى منتصف السبعينات.

إن الأكثر معقولة من الوهلة الأولى هو إفتراض أن فيروس الدرنه المغزلية مشابهاً للحمض RNA في الفيروسات المرافقة والتي تتطلب فيرس مساعد لها لتضاعف نفسها. إن الجهود التي بذلت لاثبات وجود مثل هذا الفيرس المساعد في نباتات الطماطم غير المحقونة أعطى نتائج سلبية. ولقد أظهر العلماء أنه إذا كان مثل هذا الفيرس موجوداً فيجب أن ينتقل رأسياً خلال البذور إلى أى وحدة تكاثرية أخرى في النبات. وكما هو معروف فإن إنتقال فيروسات النبات عن طريق البذور بمعدلات كبيرة هو في الواقع نسبة بسيطة جداً. نظراً لأن فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس عنده القدرة على التناسخ في عدد من أنواع نباتات العائلة الباذنجانية بالإضافة إلى البطاطس والطماطم، وبالتالي يجب أن يتكاثر الفيرس المرافق والمفترض وجوده مع الفيروس في هذه الأنواع النباتية أيضاً. لقد أظهر Diener سنة ١٩٧٢ أن أنواع نباتات العائلة الباذنجانية والتي يمكن أن تصاب عن طريق مستخلص خام يحتوى على فيروس الدرنه المغزلية يمكن أن تصلب أيضاً بحمض RNA ذو وزن جزيئى منخفض مفصلاً من polyacrylamide gels. وبالتالي إذا كانت الفيروسات المساعدة داخلة في تضاعف فيروس الدرنه المغزلية فإن مثل هذه الفيروسات يجب أن تكون موجودة بشكل عام في النباتات التي تبدو سليمة من أنواع نباتات العائلة الباذنجانية.

من تلك النتائج ومن غيرها يبدو من غير المحتمل وجود فيروسات مساعدة مع الفيروس، وبالتالي فإن فيروس الدرنه المغزلية بالرغم من حجمه الصغير يبدو أنه ذو مقدرة على التضاعف تلقائياً بذاته في النباتات العائل.

٢ - نشوء المرض Pathogenesis

نظراً للكمية الصغيرة من المعلومات الوراثية التي تدخلها الفيروسات في خلايا عوائلها، فإنه من المدهش أنه (في بعض العوائل) يمكن لبعض الفيروسات أن

تحدث أمراضاً خطيرة بأعراض متنوعة مشابهة لتلك الأعراض النموذجية المتسببة عن الإصابة الفيروسية. نظراً لأن هناك كمية صغيرة جداً من الفيروسات المعروفة تكون موجودة في الأنسجة المصابة، فإنه من غير المحتمل أن يكون هناك نقصاً في النيوكليوتيدات المتوفرة لبناء الحمض النووي للعائل وتكون مسئولة عن هذه الاضطرابات في العائل. لقد تأكد هذا الرأي بحقيقة أنه في كثير من العوائل فإن الفيروسات تتضاعف بكفاءة عالية بدون حدوث اضطراباً ظاهرة للعائل، هذا ما ذكره Sanger سنة ١٩٧٢.

هناك عدة آراء تفسر دور الفيروسات في نشوء المرض منها: -

١ - هناك تدخلاً نوعياً من قبل الفيروسات يحدث في وظائف ميتابولزم العائل مما يؤدي إلى حدوث الأمراض.

٢ - يمكن أن تعمل الفيروسات، مثلاً، كأحماض نووية RNAs ناقلة غير عادية وهذا يؤدي إلى تكوين أو بناء بروتينات ذات عيوب تركيبية.

٣ - يمكن أن تتدخل الفيروسات مع جينوم العائل من ناحية نسخ الجينوم إما بالكبح العادي للمسترونات Cistrons المعبرة أو عن طريق وقف الكبح للمسترونات المثبطة عادياً.

٤ - يمكن أن يكون التدخل إختيارياً عن طريق عديدات الببتين المترجمة عن RNA الفيرويد. بناءً على ما تقدم وبسبب محتويات الفيروسات من المعلومات المحدودة وراثياً، فإن هذه الفيروسات يمكن أن تكون موديلات أنظمة نافعة للجهود المبذولة في شرح الميكانيكية البيوكيميائية لنشوء المرض على مستوى الجزئ.

٣ - الإنتقال Transmission

إن الفيروسات المعروفة لغاية سنة ١٩٧٣ تنتقل بالطرق الميكانيكية، إما بسهولة مثل فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس وفيروس تقزم الاقحوان، وإما بصعوبة إلى حد

ما مثل فيرويد اكسوكورتر الحمضيات. بالنسبة لفيريود الدرنه المغزليه فإن الانتقال الميكانيكي يكون المسقول الرئيسى عن إنتشار المرض فى الطبيعة، هذا ما قرره Dien-er سنة ١٩٧١. ونظراً لغياب الغطاء الواقى البروتينى فإن مدة بقاء ال RNA حياً خلال عملية الانتقال من الصعوبة بمكان فهمها حتى أصبح من الواضح تماماً أن فيرويد الدرنه المغزليه وفيرويد اكسوكورتر الحمضيات يكونان موجودان ضمن الأنويه فى الخلايا المصابة، حيث فى هذه الحاله يكونان محميان جيداً من المهاجمة الانزيمية، هذا ما وجده العالم Sanger سنة ١٩٧٢. من المحتمل أثناء الإنتقال الطبيعى أن أجزاء من الأنويه المحتويه على فيرويد الدرنه المغزليه أو قطعاً من الكروماتين المحتويه على فيرويد الدرنه المغزليه تنتقل من الخلايا المصابة إلى الخلايا العاديه بطريقه أفضل من إنتقال ال RNA الحر. إن فيرويد الدرنه المغزليه ينتقل عمودياً إما خلال حبه اللقاح أو المبايض فى نباتات الطماطم والبطاطس المصابة، وإن هذا الانتقال العمودى يحدث بمعدل يختلف من صفر إلى ١٠٠٪ معتمداً على اختبارات الجمع الفرديه.

أصل الفيريديات Viroids Origin

هناك تساؤل عن أصل الفيريديات. هل الفيريديات تنتمى إلى الفيروسات أو أنها تنتمى إلى الأحماض النوويه الخلويه RNAs؟؟.

فى الوقت الذى ظهر فيه مفهوم الفيريود حدث تقدم سريع فى هذا النوع من الدراسه فكان من المعقول فى البدايه أن ينظر إلى الفيريود بأنه ذو قرابه مع الفيروسات العاديه وإقترح بأنه إما أن يكون شكل بدائى جداً للفيروس أو أنه نشأ عن الفيروسات بطريقه معينه (مثل التفكك) بحيث تكون النتيجة هى الفيريود النموذجى. بعد ذلك فإن المعلومات التى تجمعت عن الفيريديات قد جعلت كل الباحثين تتخلى عن هذه الأفكار بتزايد مستمر.

هناك عدة اراء عن أصل الفيريديات قد لخصها العالم Diener سنة ١٩٧٩. ثم

ناقشها وأوضح كثير منها وأضاف عليها العالم Sanger سنة ١٩٨٤. من هذه الأراء.

١ - إن أهم الملاحظات فيما يتعلق بأصل الفيروسات يختص باكتشافها:

وهذا يمكن توضيحه بحقيقة أن كل الأمراض الفيروسية قد أمكن التعرف عليها خلال هذا القرن، في حين أن بعضاً منها اكتشف حديثاً. وهذا بجملته يختلف عن أمراض النبات المتسببة عن الفيروسات العادية حيث أن كثيراً منها لوحظ في القرن التاسع عشر وإن أول الأمراض الفيروسية قد اكتشف في هولندا في القرن السابع عشر. أما بالنسبة للأمراض المتسببة عن فيروسات مثل فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس وفيروس اكسوكورتر الحمضيات كانت أولى الملاحظات لهما في أوائل العشرينات من هذا القرن، بينما مرض تقزم حشيشة الدينار الفيرويدي، وفيروس الشعرة الباهتة في الخيار كان أول وصف لهما في الفترة من ١٩٦٣ - ١٩٧٠ واستمر لغاية ١٩٧٤. وبشكل خاص تدل البيانات أن المرض المتسبب عن فيروس الشعرة الباهتة في الخيار كانت أول ملاحظة له في صوبة زجاجية مفردة ثم إنتشر منها، بينما مرض كادانخ - كادانخ في جوز الهند أول ذكر له كان عند ظهوره في جزيرة صغيرة في الفلبين.

من كل ما سبق يتبين أن الفيروسات حديثة الأصل، وقد افترض أنها نشأت من نشاطات الانسان مثل ادخال الزراعات الاحادية Monocultures حيث أنها قد تكون ساهمت في تكاثر وإنتشار الفيروسات والأمراض الفيروسية. ونظراً لأن الفيروسات غالباً لا تسبب اعراضاً في النباتات البرية، بالتالي افترض بأنها نشأت من عائل نباتي برى غير معروف لم تكن ممرضه عليه، ثم بعد ذلك إنتقلت إلى نباتات مزروعة حساسة بواسطة التطعيم أو بالمصادفة وهذا يكون باعثاً على تكوين RNA متناسخ وممرض وهو الفيرويد.

٢ - نشوء الفيرويد بالمصادفة من أحماض نووية RNAs عادية :

هذا الاقتراح الثانى لاصبل الفيرويدات يذكر أن الفيرويد قد نشأ بالمصادفة المحضة فى الطبيعة من أحماض نووية RNAs عادية منتظمة فى النباتات المزروعة طبيعياً أو فى النباتات البرية وتحول إلى تركيبات عالية الثبات وذات كفاءة على التناسخ الذاتى وذات قدرة على الحركة داخل وبين الخلايا. واعتماداً على ذلك فإن العالم Dien-er قد تنبأ بأن أمراض فيرويدية جديدة على النباتات المزروعة سوف تستمر فى الكشف والظهور بشكل غير متوقع.

إن الأحماض النووية RNAs ذات الأوزان الجزيئية المنخفضة بالإضافة إلى mRNA وإلى rRNA ذوات 5S تتواجد فى الخلايا العادية بشكل خاص فى الأنوية والنويات وتكون مترافقة مع الكروماتين. بالرغم من أن وظيفة هذه الأحماض غير معروفة، إلا أنه كان هناك إقتراحاً بأن بعض RNAs فى النواة قد يكون لها دوراً فى تنظيم بعض وظائف النواة وتتدخل أيضاً فى تنظيم نسخ RNA من الجينوم. كذلك وجد أن بناء RNA فى نظام الخلية الحر بواسطة أنزيم Polymerase بكتيريا *E. coli* باعتبار الكروماتين قالب شجعت بإضافة RNA كروماتينى ذو الوزن الجزيئى المنخفض بينما (فى حالة DNA كقالب) فإن بناء RNA كان يثبط بإضافة مثل هذا الحمض RNA.

إن فيرويد الدرنه المغزلية المتصور والذى يكون مرافقاً للكروماتين والذى يكون فى نفس مجال الوزن الجزيئى يمكن أن يكون متعلقاً ببعض الأحماض النووية RNAs فى النواة والنوية. وبالتالي فإن الباحث قد يتأمل فى أن فيرويد الدرنه المغزلية، ومن المحتمل فيرويدات أخرى نشأت من RNAs من النواة والتى تكون مكونات عادية للكائن والتى تكون أيضاً أساسية لتكشفه. إن تحول RNA من مكون عادى فى الخلية إلى مسبب مرضى ممكن أن يحدث إما بواسطة طفرة أو بواسطة دخوله مصادفة فى نوع غريب والذى يتناسخ فيه هذا ال RNA. فى أى من الحالتين فإن المرض سيكون هو نتيجة التداخل مع الوظائف العادية للأحماض RNAs فى النواة.

٣ - حدوث تداخل فى تتابع النيوكليوتيدات فى الحمض النووى RNA:

قد تكون الفيروسيدات نشأت من حدوث تداخل فى تتابع النيوكليوتيدات فى الحمض النووى RNA. هذا الافتراض يبدو أنه مدعماً بتمائل التتابع بين معظم تنوعات التتابع وتتابعات الفيروسيدات (باستثناء فيروس ضربة الشمس فى الافوكادو) والنهاية 5' للحمض RNA U1، حمض نووى صغير RNA يعتقد بأنه يدخل فى عملية التراكب للحمض mRNA.

عندما اكتشفت الجينات المنشقة Split genes فى الكائنات مميزة النواة وتراكب RNA (عملية التراكب تشبه القص واللصق ويتم بواسطة معقد اسمه Spliceosome)، عندئذ إقترح بأن الفيروسيدات من الممكن أن تكون قد نشأت بواسطة الانترونات Introns. يمكن تعريف الانترونات بأنها التتابعات التى توجد فى DNA مميزة النواة ولكنها تحذف من mRNA أثناء تجهيزه بحيث يصل إلى الطور الناضج خال منها.

يستطيع الباحث أن يتأمل بأن مثل هذه التتابعات يمكن أن تتيح الفرصة لكثير من الجزيئات الوسيطة ذات القواعد المزدوجة (كما تفعل الفيروسيدات)، وإذا ما أصبحت دائرية (كما هى الفيروسيدات) وبالتالي فإن هذه الجزيئات تصبح ثابتة وتنجو من التحطيم. إن إتخاذ الانترونات للشكل الدائرى قد لوحظ فى دراسات Borst سنة ١٩٨١ وذكر أن بعضاً منها تأخذ حجم الفيروسيدات تقريباً. والذى يمكن تصويره أن مثل هذه الانترونات يمكن أن تشكل تتابع ملائم مميز ويمكن أن تنسخ بواسطة أنزيم العائل القادر على العمل كأنزيم RNA polymerase للحمض RNA الموجه وبالتالي تنجو من ميكانيكية التوجيه فى خلية العائل.

إن الأحماض النووية الصغيرة من RNA المترافقة مع أجزاء من رايونيوكلو بروتين يعتقد بأنها داخلة فى علمية النسخ الأولية لمنتجات الجينات المنشقة. إن النهاية رقم 5' من حمض نووى مثل RNA U1 قد تبين بأنه يسلك كمكمل مع

نهايات الانترونات، ومن المعتقد أن هذا يعطى ميكانيكية تؤكد الاصلاح بالحذف لتتابع الانترون ودقة ارتباط تتابع التشفير.

مع أن التركيب الأولى للأحماض النووية الصغيرة SnRNA's غير مؤكد تماماً، إلا أن الدراسات الحديثة للجين المنشق فى أنواع النباتات الراقية ومثيلاتها من تتابع أطراف إنترون - إكسون مع تلك التى فى مميزة النواة، أدت إلى الاقتراح بأن SnRNA مماثل لـ RNA U1 الموجود فى النباتات الراقية وأن تتابع النهاية 5' مشابهة لـ U1RNA. وإذا كان هذا صحيحاً فإن نظرية الانترون لاصل الفيرويد تنبأ أن تتابع نيوكليتيدي معين على الفيرويدات أن تسلكه كمثل للنهية 5' لهذا الحمض النووى الصغير المزعم SnRNA بالإضافة إلى U1RNA.

ومن ناحية هذه التشابهات كان من الأفضل تحديد فيما إذا كانت تتابعات النيوكليتيديات فى فيرويد الدرة المغزلية فى البطاطس تحتوى على مطاطية كافية لتكوين تكامل مع النهاية 5' للحمض U1RNA أو لا تحتوى، ولكن الاستقصاء عن مثل هذه التتابعات فشل فى الكشف عن امكانية تكوين معقدات ثابتة بين RNA لفيريود الدرة المغزلية فى البطاطس وU1RNA. وعلى أية حال لأن RNA الفيرويدي فى البطاطس يبدو بأنه ينسخ عن قالب RNA، فإن الخيط الكامل وليس الفيرويد نفسه يمكن أن يمثل إنترون ثابت ويسلك سلوك تكميلي مع U1RNA.

٤ - احتمالية نشوء الفيرويدات من الفيروسايدات Virusoids :

يمكن أن تكون الفيرويدات قد نشأت من الفيروسايدات وهى أحماض نووية RNAs دائرية صغيرة مغلفة فى بعض الفيروسات النباتية بجينوم ثنائى الشق dipartite. إن الاختلافات الأساسية بين الفيرويد والفيروسايد virusoid يبدو أنه فى كون الفيرويد يتناسخ بواسطة أنزيم العائل polymerase، بينما الفيروسايد يعتمد على أنزيم Replicase الفيروسي لتناسخه. وتختلف الفيرويدات عن الفيروسايدات فى النقاط الآتية: -

أ - لا يوجد تماثل في التابع يمكن تقديره بين الفيرويدات والفيروسايدات.

ب - تختلف الفيروسايدات عن الفيرويدات في الصفات الثيرموديناميكية والهيدروديناميكية وهي بهذه الصفات تتشابه جداً مع التابع العشوائي ومع طول وتركيب القاعدة ودائرية الفيرويدات.

٥ - يمكن أن تكون الفيرويدات قد نشأت من نظام تبادل المعلومات الوراثية بين خلايا مميزة النواة وعضيات الخلية:

يمكن أن تكون الفيرويدات والحمض RNA الفيروسي قد نشأت من نظام تبادل المعلومات الوراثية بين خلايا مميزة النواة وعضيات الخلية. هذا الاعتقاد متوقع جداً وهو يفترض أن الفيرويدات قادرة على إصابة النبات جهازياً ويمكنها أن تعتمد على ميكائزم العائل في الانتقال داخل الخلايا والتضاعف بسبب أن خلايا العائل (النبات) العادية تحتوي تركيبات لها صلة مع الأحماض RNAs والتي هي أيضاً قادرة على الانتقال والتضاعف لكي تسهل تكبيرها و-Extrachromosomal inheri- tance ومن الواضح أن مثل هذا النظام إذا وجد يمكن أن يكون مصدراً لتطور الفيرويدات وحمض RNA الفيروسي.

٦ - يمكن أن تكون الفيرويدات نشأت من كائنات أولية النواة:

لقد افترض أن الفيرويدات نشأت من الحمض النووي RNA في الكائنات الأولية النواة عن طريق إصابة النباتات الراقية بواسطة كائنات غير مميزة النواة. بنى هذا الافتراض على ما وجد من أنه ليس فقط RNA polymerase في مميزة النواة ولكن أيضاً أنزيمات RNA and DNA - Polymerase من البكتريا E. coli قادرة على نسخ RNA الفيرويدي في المعمل إلى نسخ مكتملة من RNA و DNA. وعلى أية حال فإن التابع المتعلق بالفيرويد لغاية الآن لم يمكن اكتشافه في أولية النواة.

٧ - يمكن أن تكون الفيروسات إشتقت من عناصر وراثية مترجمة :

يمكن أن تكون الفيروسات قد إشتقت من عناصر وراثية مترجمة Transposable genetic elements . لقد ذكر Kiefer et al سنة ١٩٨٣ أن تركيبات الفيروسات تحتوي تتابعات مشابهة لتلك الحادثة في نهايات بعض العناصر الوراثية القابلة للتحرك وكل من Retroviral - proviruses شاملة وجود التكرار المعكوس الذى يكون غالباً منتهياً بشتاتية النيوكليوتيد U - G و C - A مطوقاً بشكل غير كامل مباشرة التكرار ومطاطية طويلة من البيورين موجودة فى كثير من الفيروسات والتي تشابه التتابع التمهيدى لانزيم النسخ العكسى للخطى الموجب فى بناء DNA لـ Retroviral proviruses . وبالتالي يمكن القول بأن الفيروسات نشأت من العناصر القابلة للانتقال أو Retroviral proviruses عن طريق ازالة معظم المناطق الداخلية بالإضافة إلى التدخل فى تتابعات العائل .

إن تماثل التتابع لأكثر من ٧٠٪ من فيروسات مجموعة PSTVd (فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس) يمكن أن يدل على أن اصولها من جد واحد أو (هذا أكثر احتمالاً) أن نشوءها فى مناطق جغرافية . متفرقة يدل على أنها نشأت من جدد مختلفة من RNA . ونظراً لأن تتابع الفيروس لا يحدث فى DNA العائل يستبعد أن تكون الفيروسات من أصل RNA ناتج من DNA . ونظراً لأن التتابع المتماثل مع UI RNA والصفات التركيبية تشبه العناصر القابلة للانتقال وتشبه Retroviral proviruses الناشئة من الأحماض RNAs غير الممرضة من الأنواع غير المتقاربة من مميزة النواة .

تتابع اكتشاف الفيروسات :

إن أول كائن ممرض امكن تمييزه وتعريفه على أنه فيروس هو العامل المسبب لمرض الدرنه المغزلية فى البطاطس Potato spindle tuber viroid (كان يكتب

باختصار PSTV ولكن بعد سنة ١٩٩٢ إتفق العلماء على إضافة حرف (d) لتمييزها عن اسم الفيروسات وأصبح يكتب PSTVd. لذا يلاحظ أن الفيروسات كانت تكتب بدون حرف d ثم بعد الاتفاق أصبحت جميع الأسماء يضاف إليها هذا الحرف، والذي كان ينظر إليه لمدة طويلة بأنه فيروس. كان أول إثبات على خطأ هذا الاعتقاد بواسطة العلماء Diener & Raymer سنة ١٩٦٧ حيث ذكروا بأن الكائن الممرض عبارة عن حمض RNA حر ولا يوجد أى جزيئات يطلق عليها علمياً اسم فيروس فى النبات المصاب. عندما تأكد الوزن الجزيئى لهذا الكائن الممرض سنة ١٩٧١ بواسطة كل من Diener و Singh فقد استعمل اصطلاح فيروس = Viroid = لى يمكن التفريق بين هذه الأحماض النووية RNAs المعدية والخالية من البروتين، وبين الفيروسات الكلاسيكية المألوفة التى تكون مغلفة بكبسولة من البروتين.

أما الكائن الثانى الذى أمكن تمييزه كفيروس يصيب النباتات هو مسبب مرض اكسوكورتز الحمضيات Citrus Exocortis Viroid وأطلق عليه CEVd وذلك بواسطة Semacik & Sanger سنة ١٩٧٢. ثم بعد ذلك اكتشف فيروس تقزم الاقحوان Chrysanthemum stunt viroid (CSVd) وذلك بواسطة Hollings و Diener سنة ١٩٧٣. ثم بعد ذلك توالى اكتشافات الأمراض الفيروسية ومسبباتها كما فى جدول رقم ١، وإن معظم هذه الأمراض ذات أهمية إقتصادية فى المحاصيل النباتية. فمثلاً فيروس كادانج - كادانج Cadang - Cadang الذى يصيب نخيل جوز الهند يسبب خسائر شديدة فى مزارع واسعة وهدد بشدة إقتصاد جميع المناطق التى تزرع فيها فى الفلبين.

جدول ١: الأمراض الفيروسية المكتشفة حتى سنة ١٩٨٣

اسم المرض الفيروسي	المدى العائلي	الاختصار	سنة الاكتشاف	المكان المكتشف
١ - Potato spindle tuber Viroid	معظم نباتات العائلة الباذنجانية	PSTVd	١٩٧١	Diener
الذرة المغزلية في البطاطس				Singh & Clark
٢ - Citrus exocortis Viroid	الحمضيات، العائلة المركبة	CEVd	١٩٧٢	Sanger
أكسوكورز الحمضيات	العائلة الباذنجانية			Semancik & Weathers
٣ - Chrysanthemum Stunt Viroid	أنواع من العائلة المركبة	CSVd	١٩٧٣	Hollings & Stone
تقرم الأقحوان				Diener & Lawson
٤ - Chrysanthemum chlorotic mottle Viroid	أنواع من العائلة للمركبة	CCMVd	١٩٧٥	Remaine & Horst
الشحوب المتفرش في الأقحوان				Van Dorst & Peters
٥ - Cucumber pale Fruit	العائلة القرعية والطماطم	CPFVd	١٩٧٤	Sanger et al
الذرة البامطة في العيار			١٩٧٦	Randles
٦ - Coconut cadang - cadang	نخل جوز الهند	OCCVd	١٩٧٥	Randles et al
كاناتنج - كاناتنج في جوز الهند			١٩٧٦	Sasaki & Shokata
٧ - Hop Stunt	العائلة الباذنجانية العائلة القرعية	HSVd	١٩٧٧	Owens et al
تقرم حبيبة البنار			١٩٧٨	Thomas & Mohamed
٨ - Columnea erythrophae			١٩٧٩	Mohamed & Thomas
كولينا الكاس			١٩٨٠	Walker
٩ - Avocado sun blotch	الأوكادو	ASBVd	١٩٧٩	Gallindo et al
ضربة الشمس في الأوكادو	القرعة		١٩٨٠	Chen et al
١٠ - Tomato apical Stunt	معظم نباتات العائلة الباذنجانية	TASVd	١٩٨١	
تقرم قمة الطماطم			١٩٨٢	
١١ - Tomato plantin macho	الطماطم وبعض نباتات العائلة الباذنجانية	TPMVd	١٩٨٢	
النبات الذكور في الطماطم	الباردوك	BSVd	١٩٨٣	
١٢ - Burdock Stunt				

ملاحظة هامة :

١ - كان يكتب اسم الفيروس بأحد الحرف الأول من كل كلمة لغاية سنة ١٩٩٢ لم بعد ذلك إتفق العلماء على إضافة حرف (d) بعد حرف الـ (v) لتمييزه عن الفيروس ولزيادة عدد الفيروسات المكتشفه.

٢ - كان المرض رقم (١٠) يسمى سابقاً Tomato bunchy top disease.

مراجع خاصة بالفصل الأول

- 1 - Diener, T. O., Raymer, W. B. 1967. Science 158 : 378 - 381.
- 2 - ————— 1971. Comparative Virology ed. K. Maramorosch E. Kurstak, 433 - 467 New York Academic Press. 584.
- 3 - ————— 1972. Advance Virus Res. 17 : 295 - 313.
- 4 - ————— 1963. Virology 8 : 7 - 30.
- 5 - ————— et al. 1974. Virology 57 : 577 - 581.
- 6 - ————— 1979. science 205 : 859 - 866.
- 7 - Semancik, J. S., Weathers, L. G. 1968. Virology 36 : 326 - 328.
- 8 - ————— . 1970. Phytopathol. 60 : 732 - 736.
- 9 - ————— . 1972. Nature New Biol., 237 : 242 - 244.
- 10 - ————— . 1973. Virology 53 : 448 - 456.
- 11 - Singh, R. P., Bagnall, R. H. 1968. Phytopathol. 58 : 696 - 699.
- 12 - ————— and Clark, M. C. 1971. Biochem. Biophys. Res. Commun 44 : 1077 - 83.
- 13 - Lawson, R. H. 1968. Phytopathol. 58 : 885 Abs.
- 14 - Loening, U. E. 1967. Biochemist J. 102 : 251 - 257.
- 15 - Kleinschmidt, A. K., Zahn, R. K. 1959. Z. Naturforsch B 14 : 770 - 779.
- 16 - Engelhardt, D. L. 1972. J. Virol. 9 : 903 - 908.

- 17 - Sogo, J. M., Koller, T., Diener, T. O. 1973. Virology: 55 : 168 - 170.
- 18 - Boedtker, H. 1971. Biochem. Biophys. Acta. 240 : 299 - 308.
- 19 - Sanger, H. L. 1972. Advan. Biosci, 8 : 103 - 116.
- 20 - ————. 1984. Microb, 281 - 334.
- 21 - Zaitlin, M., Hariharasubramanian, V. 1972. Virology 47 : 296 - 305.

الفصل الثانى

الفيروسيدات وتفاعلاتها مع المائل

Viroids And Their Interaction With The Host

مقدمة Introduction :

الفيروسيدات هى عبارة عن أحماض نووية ذات وزن جزيئى منخفض (١,١ × ١٠^٥) ذائتوت وذات تركيب فريد، يمكن عزلها من أنواع معينة من النباتات الراقية التى تعاني من أمراض معينة مميزة. الفيروسيدات لم تكتشف ولم تعرف فى الأفراد السليمة من نفس تلك الأنواع التى تظهر عليها الأعراض، ولكن عند ادخالها فى مثل تلك الأفراد فإنها تتضاعف (تنسخ) تلقائياً بذاتها بالرغم من صغر حجمها وتسبب مجموعة الأعراض المرضية التى تظهر على النبات. وبالتالي فإن الفيروسيدات هى عوامل مسببة للأمراض.

إن الفيروسيدات غير مشابهة للأحماض النووية الفيروسية حيث أنها أحماض نووية غير مغلقة، وكذلك فهى غير مشابهة للفيروسات Viroons حيث أنه لم يعزل أى فايرون من النسيج المصاب (الفايرون هو جزيء واحد من الفيروس)، وتختلف فى جميع صفاتها عن الفايرونات. جميع أفراد الفيروسيدات التى عرفت حتى الآن تتكون من حمض نووى RNA وجميعها قد عزلت من نباتات راقية. تشكل الفيروسيدات صف Class جديد من الكائنات الممرضة تحت الفيروسية وهى أصغر العوامل المعروفة المسببة لأمراض معدية.

حصل تقدم كبير فى مفهوم الفيروسات منذ تسميتها سنة ١٩٧١ بواسطة العالم Diener وذلك عندما وضع أسس جديدة لهذا العلم مبنية على صفات العامل المعدى المسئول عن مرض الدرنه المغزلية فى البطاطس. لقد وجد أن هذه الصفات تختلف أساسياً عن تلك الصفات التقليدية والمعروفة للفيروسات على الأقل فى خمسة اعتبارات هامة.

١ - يوجد الفيروس فى الطبيعة على شكل حمض نووى RNA غير مغلف بكبسولة أو غطاء بروتينى .

٢ - لم يكتشف فايرون أو أجسام شبيهة بالفايرون فى النسيج المصاب بالفيروسات.

٣ - الحمض النووى RNA فى الفيروسات ذو وزن جزيئى منخفض.

٤ - بالرغم من صغر حجم الحمض النووى RNA المعدى إلا أنه ينسخ ويتضاعف تلقائياً بذاته فى الخلايا القابلة للإصابة، هذا يعنى أنه لا يتطلب فيروس مساعد (كان فى بداية الأبحاث يعتقد بضرورة وجود فيروس مساعد مع الفيروس لكى يتكاثر).

٥ - يتكون الفيروس من حمض نووى ذو تركيب أولى وثانوى وثالث وفى النهاية يأخذ شكل دائرة.

مما سبق يمكن القول بأن الفيروس عبارة عن كائن حيوى متميز عن مسببات الأمراض الأخرى.

إذا ما نظر الباحث إلى الكتب الحديثة التى تبحث فى الكيمياء الحيوية، البيولوجيا الجزيئية أو الكائنات الحية الدقيقة، فإنه يمكن أن يلاحظ فى هذه الكتب ما ملخصه أن الفيروسات هى أصغر مسببات الأمراض تتكون من RNA وهى أصغر التركيبات ذات التضاعف (التناسخ) الذاتى وهى أقل المستويات فى التسلسل الهرمى فى الحياة.

تعتبر الفيروسات من المسائل المثيرة والمربية، ليس فقط من ناحية البيولوجيا الجزيئية ولكن أيضاً من ناحية علم الفيروس، علم أمراض النبات، الفيزياء الحيوية وفى علوم أخرى ذات صلة بها. إن الزيادة الواضحة فى معرفتنا عن الفيروسات يمكن أن تلاحظ بزيادة الأبحاث التى تجرى عليها باستمرار.

يمكن القول بأن الفيروس عبارة عن حمض نووى RNA احادى الخيط تتخلله أجزاء دائرية، يتكون من بضع مئات من النيوكليوتيدات ويكون ممرض فى النباتات الراقية فقط. لوحظت الأهمية الاقتصادية للأمراض الفيروسية فى النباتات منذ الربع الأول من القرن العشرين، ولكن فى تلك الفترة كانت تعتبر هذه الأمراض متسببة عن فيروسات.

فى بعض الاعتبارات هناك ظاهرة تشبه الفيروسات وهى الفيروساتيدات Virusoids، وهذه الأخيرة عبارة عن جزيئات من الحمض RNA بحجم وتركيب يشبه الفيروس وتكون مغلفة مع بعضها البعض بحجم كبير من RNA كما فى كثير من الفيروسات النباتية وهى لا تتناسخ ذاتياً ولكن بعضها يسلك مثل RNAs المرافقة للفيروسات العادية والبعض الآخر يمكن أن يكون جزء مكمل فى آلية التناسخ فى الفيروس.

تفاعلات خلية عائل الفيروس Virioid - Host Cell Interactions

عندما تدخل الفيروسات فى الخلايا القابلة للإصابة فإنها تتضاعف ذاتياً، هذا يعنى بدون الحاجة إلى فيروس مساعد. هذه القاعدة البيولوجية الحقيقية أثارت عدداً من الأسئلة مثيرة للاهتمام أهم هذه التساؤلات هى:-

- ١ - باى ميكانيكية تتضاعف الفيروسات؟؟ ونظراً لأن الفيروسات قد تحددت على أنها أنواع مميزة ذات وزن جزيئى منخفض من الحمض النووى RNA هذا الذى يدخل كمية قليلة جداً من المعلومات الوراثية فى خلايا المائل. لذا يبدو أولاً أن أنزيمات المائل الموجودة قبل دخول الفيروسات، معظمها أو كلها تكون مسؤولة عن تضاعف الفيروس.

٢ - باى ميكانيكية تحدث الفيرويدات المرض فى عوائل معينة ٩٩ علاوة على ذلك فإنها تتكاثر فى أنواع نباتية أخرى قابلة للإصابة بدون إحداث أضرار مميزة فى العائل ١١.

فى الصفحات اللاحقة إن شاء الله سوف نجد أجوبة لهذه التساؤلات.

موقع الفيرويدات فى الخلية Subcellular Location :

لقد أظهرت الاختبارات الحيوية للأجزاء تحت الخلوية من أوراق طماطم مصابة بفيرويد PSTVd أن أجزاء النواة فقط تحتوى على فيرويد يمكن تقديره. أما الكلوروبلاست، الميتوكوندريا، الرايبوسومات والأجزاء الذائبة تحتوى على آثار فقط من الفيرويد. إن معظم كمية الفيرويد فى النبات تكون مرافقة للكروماتين ويمكن استخلاصها على شكل حمض نووى RNA حر بدون منظم فسفاتى. إن فيرويد اكسوكورترز الحمضيات CEVd يكون أيضاً بشكل أساسى فى مكونات النواة ملاصقاً تماماً للكروماتين أما بالنسبة لهذا الفيرويد عندما يصيب نبات *Gynura aurantiaca* فإن كمية لا بأس بها من الفيرويد تكون مرافقة لمكونات شبه غشائية للبلازما فى الجهاز الغشائى الداخلى، هذا ما ذكره العالم Semancik سنة ١٩٧٦ .

إن الحقيقة التى تقول بأن PSTVd المعدى يكون موجوداً أولاً فى أنوية الخلايا لم تقدم الدليل على أنه يبنى هناك، وعلى أية حال فإن التجارب المعملية على نظام بناء RNA والتى فيها يستعمل أنوية خلايا نقية من أوراق طماطم مصابة كمصدر أنزيمى، أعطت هذه النتائج المذكورة، وبالتالي يبدو أن الفيرويد المعدى الداخلى فى النبات يتحرك إلى النواة (بميكانيكية معينة) ويتكاثر هناك. إن غياب كميات معنوية من PSTVd من أجزاء أو مكونات السيتوبلازم فى الخلايا المصابة يؤدى إلى القول بأن معظم الذرية الناتجة من تكاثر الفيرويد تبقى فى النواة.

وبشكل عام فإن الفيرويدات توجد فى الطبيعة على شكل معقدات مع المكونات النووية وموجودة فى أجزاء خاصة أو عضيات الخلية. إن الدراسات

الحديثة التى بنيت على إختبارات الحيوية قد أثبتت أن الفيروسات مرافقة بشكل أساسى مع الأنوية و / أو الأغشية النووية. وفى أبحاث أخرى فإن الأنوية عالية النفاوة والكلوروبلاست من نسيج ورقة طاطم قد استعمل فى الدراسة ومحتواها من PSTVd قد حدد كمياً بواسطة الاتجاه المزدوج من الهجرة الكهربائية فى الجيل، فقد وجد أن ٧٩٥٪ من RNA الفيرويدي فى الأنوية، لا يوجد تجانس فى التوزيع داخل النواة ولكنه مترافقاً مع أجزاء النوية. عند زيادة القوة الأيونية، هذا يؤدي إلى إنطلاق الفيروسات. لقد استنتج من كل ما سبق أن الفيروسات مترافقة مع النوية بواسطة بروتين حمض نووى. اعتماداً على ما تقدم وجد أن متوسط عدد نسخ الفيرويد بين ٦٠٠ - ١٠٠٠٠ نسخة فى الخلية.

ترجمة الفيرويد Virioid Translation :

إن الفيروسات ذات سلسلة طولها كاف لأن يشفر للعديد من الببتيدات حوالى ١٠٠٠٠ دالتون، مع أنه فى حالة PSTVd الدائرى فإن العدد الفردى للنيوكليوتيدات والذى من ناحية نظرية يسمح بثلاثة دورات فى الترجمة بطريقة تغير كل مرة.

الإختبارات التى أجريت فى المعمل على RNA لفيرويد PSTVd و CEVd لكى يقوم بوظيفة tRNA فى أنظمة مختلفة لبناء البروتين فى الخلية المفردة الحرة، أعطى دليلاً على أنه لا يوجد أى من هذين الفيرويديين عنده كفاءة لمثل هذه الوظيفة. وجد أن CEVd أيضاً لا يترجم فى بويضات *Xenopus laevis* حتى بعد أن أجرى له عملية polyadenylation فى المعمل ولم يمكنه أن يتدخل فى ترجمة mRNAs الداخلى. إن افتقار PSTVd إلى حيوية ونشاط mRNA ليست غريبة بالنظر إلى حقيقة أنه لا يوجد كودون الابتداء AUG فى ترتيب نيوكليوتيداته (هناك عديداً من المجموعات الثلاثية GUG من الممكن أن تعمل كبداى).

مع أن الفيروسات لا تعمل مثل mRNA's فى هذه الأنظمة، إلا أنها يمكن أن تترجم فى الطبيعة عن سلسلة مكاملة من RNA مبنية بواسطة أنزيمات العائل الموجودة مسبقاً مع استعمال RNA الفيرويدي المعدى كقالب. لقد حددت

وعرفت تتابعات النيوكليوتيدات في RNA المكمل للفيروس في النسيج المصطب وذلك بواسطة العالم Owens سنة ١٩٨٠. ولقد اقترح أن هذه السلسلة المكمل للفيروس يمكن أن تعمل عمل RNA's. أما بالنسبة لفيروس PSTVd فإن السلسلة المكمل له (cPSTVd) كما أنشأت حسب تتابع نيوكليوتيدات الفيروس يمكن نظرياً أن تعمل عمل mRNA. مع أن cPSTVd لا يحتوى على أى من الوحدات الثلاثة الابتدائية (لبء البناء) AUG إلا أنه يحتوى أربعة وحدات ثلاثية GUG وستة وحدات ثلاثية لتوقف البناء والتي نظرياً تؤدي إلى أربعة عديدات الببتين تحتوى ١٠٨، ٧٩، ٤٣ أو ٢٨ حمض أميني. وسواء كان أم لم يكن RNA's المكمل للفيروس يعمل عمل mRNA's (لا يعرف حتى الآن) إلا أنها إذا كانت تعمل فإن بروتينات خاصة فيروسية غريبة يمكن أن تكتشف في مخضرات البروتين من نسيج العائل المصاب.

إن المقارنة بين أنواع البروتين في الطماطم السليمة والمصابة بفيروس PSTVd وفي نباتات *Gynura aurantiaca* سليمة ومصابة بفيروس CEVd، على أية حال، لم تظهر اختلافات نوعية بين النباتات السليمة والمصابة. في تلك الدراستين ظهر أن هناك زيادة في بناء إثنين من البروتينات على الأقل في النباتات المصابة عنه في نسيج النباتات السليمة، ولكن تبين بعد ذلك أن هذين البروتينين خاصين بالعائل وليس بالفيروس. كذلك فإن التحليل بالهجرة الكهربائية في الجيل ذات الاتجاهين للبروتينات المصنعة في كل من خلايا الطماطم المصابة أو غير المصابة بفيروس PSTVd والمأخوذ من المزارع المعلقة أظهرت أنه لا يوجد تغيرات كمية ولا كيفية تنتج عن بقاء الفيروس داخل الخلية.

علاوة على ذلك برغم أن طرقاً أكثر حساسية في التحليل يمكن أن تكشف عن وجود عديد من بروتينات خاصة بالفيروس في الخلايا المصابة، إلا أنه في ضوء المعلومات الحالية يجب أن نخرج بنتيجة أن الفيروسات لا تعمل عمل mRNA's. وإذا كان كذلك فإن ترتيب نيوكليوتيدات cRNA الموجود في النسيج المصاب يجب أن يكون قد صنع كلية بواسطة أنزيمات العائل الموجودة سابقاً إلا أنها من الممكن أن تكون قد استحثت.

تركيب الجزيء Molecular Structure

مقدمة :-

الفيرويدات هي جزيئات من RNA احادى السلسلة مكون من شكلين دائرى مغلق ومستقيم ويتخلل هذين الشكلين من RNA مناطق قصيرة تأخذ شكل قريب من الحلزون المزدوج والتي تتكون نتيجة لتكوين ما يسمى بتركيب دبوس الشعر hairpin بين تنابعات متكاملة كثيرة موجودة فى الجزيء بحيث تتزواج عند أنواعها وتكون مناطق مزدوجة السلسلة والتي تظهر تحت الميكروسكوب الالكترونى كأنها عصيات مزدوجة السلسلة.

لقد تحدد ترتيب النيوكليتيديات كاملاً فى فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس وذلك بواسطة العالم Gross سنة ١٩٧٨ . واعتماداً على أساسيات هذا الترتيب بالإضافة إلى دراسات الدنميكا الحرارية Thermodynamic والنشاط الانتقالى لدرجات الحرارة المدنترة لهذا الفرويد، إقترح نموذجاً للتركيب الثانوى لفرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس. واعتماداً على هذا النموذج فإن الفيرويدات توجد فى شكلها الطبيعى على هيئة تركيب يشبه العصى ممتد يتميز بسلسلة من قطع ذات شكل حلزونى مع وجود عروات داخلية. وبالتالى فإن التركيب شبه العصى الذى كان يفترض للفيرويدات الطبيعية يعتبر الآن غير صحيح ومبنياً على النقص ويفضل عليه التركيب شبه العصى ذو العروات الداخلية وأطراف شبه دائرية مع تركيب دبوس الشعر.

بعد ذلك فإن الترتيب الكامل لنيوكليتيديات فيرويد تقزم الاقحوان CSVd قد تحدد بواسطة العالم Haseloff سنة ١٩٨١ . وبالمقارنة الواضحة مع فيرويد الدرنه المغزلية PSTVd الذى يتكون من ٣٥٩ نيوكليتيده فإن فيرويد CSVd يتكون من حمض نووى RNA وحيد السلسلة دائرى مغلق يتكون من ٣٥٦ نيوكليتيده، من

بين هذه النيوكلييتيدات المتتابعة هناك ٦٩٪ منها موجود في فيرويد PSTVd وبالتالي فإن كلا الفيرويديين يمكن أن يشكلوا تركيب ثانوى متماثل.

كذلك فإن السلالات المعتدلة من PSTVd قد أجرى لها عملية ترتيب، وإن نتائج التركيب الأولى قورنت مع تلك التى حددت سابقاً للسلالات الشديدة. تبين أن السلالات المعتدلة تختلف عن السلالات الشديدة بثلاثة نيوكلييتيدات تتواجد فى مواقع مختلفة من الجزيء وهى AA إلى U فى الموقع ١٢٠ - ١٢١، A إلى U فى الموقع ٣١٠ ودخول U بين موقعى ٣١٢، ٣١٣ كما حدده Gross سنة ١٩٨١.

إن هذه النتائج متسقة مع النتائج السابقة والتى ذكرت أن الفيرويدات تتكون من أنظمة وراثية صفاتها مشفرة فى ترتيب النيوكلييتيدات فى RNAs. وبالتالي فإن ترتيب النيوكلييتيدات فى النوع المفرد من الفيرويدات يختلف بشكل واضح عن بعضها البعض، بينما ترتيب سلالات النوع الواحد يختلف إختلافاً بسيطاً فقط. ومن المهم أن نذكر أن الاختلافات البسيطة فى ترتيب السلالات المعتدلة والشديدة فى فيرويد PSTVd لم يكن يتوقع أن يكون لها مثل هذه النتيجة البيولوجية العميقة.

١ - التركيب الأولى والثانوى Primary and Secondary Sturcture

إن وصف الفيرويدات بأنها حمض نووى RNA خال من البروتين وثبوت صغر حجمها والتعرف على شكلها الدائرى، كل ذلك كان سبباً أساسياً لدراسة تتابع النيوكلييتيدات فيها وتركيبها الثانوى المعقد. وعلى كل حال فإن الإسهاب فى شرح التركيب، الشكل شبه العصى والخيوط المفرد، موديل التركيب الثانوى الذى يتكون من عروات وحلزون Loops and helixes أصبحت معروفة جيداً قبل أن يتحدد تتابع النيوكلييتيدات.

هناك طريقة واحدة يبدو أنها تبشر بنجاح الحصول على تفصيل متقن للترتيب الكامل للنيوكليتيدات في الفيروس:

في المعمل فإن تعليم 5' لأجزاء الفيروس التي حصل عليها بواسطة الهضم الكلى أو الجزئي باستعمال أنزيم رايونيوكليز النوعى مع 5'- polynucleotide Ki-nase و $ATP^{32}(\alpha-p)$. إن أول تركيب كامل للفيروس كان قد تحدد بواسطة هذه الطريقة، كان للفيروس PSTVd. هذا يؤكد دون التباس وجود الشكل الدائرى فى الجزئ ويظهر عديداً من صفات التركيب والتي أصبحت نموذجية لجميع الفيروسات. أما النيوكليتيدات المتحورة نوعاً ما كما فى تلك الموجودة فى tRNA لم يمكن تعريفها.

إن التركيب الثانوى للفيروسات كان قد أستنتج من نتائج التجارب ومن مدلولات النظريات. إن التركيب الثانوى للفيروسات يكون فى شكل سلسلة غير متفرعة من لولب قصير مضاعف ذو عروات داخلية صغيرة. كل هذا كان واضحاً تماماً فى فيروس PSTVd وتؤكد بواسطة كل التتابعات التي حددت فيما بعد.

وأخيراً فإن نظام التتابع الثانوى قد استعمل بنجاح فى كل من :-

١ - نسخ الفيروس المستقيم إلى cDNA.

٢ - الكلونة Cloning.

٣ - تتابع cDNA للفيروس المكلون وذلك بالاعتماد على تكنيك تتابع ال DNA.

مع أن مراقبة التتابع بواسطة التعليم بالاشعاع فى المعمل قد أظهر بأن تجمعات الفيروس تحتوى على تتابع مختلف وأن ترتيب العديد من cDNA المكلون للفيروس



شكل رقم ٢ :

التتابع والتركيب الثانوى للفيريدات. CCCVd I - small. يحتوى ٢٤٧ نيوكليوتيد. التابع فى المنطقة المحفوظة كملب تسمى المنطقة عالية الحفظ.

الواحد يسمح بتوطيد وتثبيت التتابع الفردى للمتغيرات حتى فى تلك الحالات حيث أن عدم التجانس لا يعرف بواسطة التتابع المباشر للحمض RNA.

فى شكل (٢) تتابع بعض الفيرويدات مرسوم فى تركيبها الثانوى والذى هو مأخوذ من ورقة البحث الأساسية وإن المقارنة بين تتابع هذه الفيرويدات يدل على أن هناك على الأقل ثلاثة مجموعات من الفيرويدات:-

١ - مجموعة PSTVd والتي تضم CEVd، TASVd، TPMVd، PSTVd، CSVd، وإلى حد ما HSVd و CPFVd.

٢ - مجموعة ASBVd.

٣ - مجموعة CCCVd. إلا أن هذا سيوضح بالتفصيل فى دراسة التصنيف فيما بعد.

فى جدول رقم ٢ هناك بعض المعلومات الكمية عن التتابع والتركيب الثانوى للفيرويد. إن أفراد مجموعة PSTVd تتميز بالتتابع المتماثل (المتناظر) لحوالى ٦٠ - ٧٠٪ أو أكثر من حيث نيوكليوتيداتها A:U, G:C، وبالتالى فإن نسبة البيورين إلى البيرميدين تكون واحدة تقريباً وهناك حوالى الضعف من أزواج القواعد G:C بالنسبة إلى A:U. إن بين ٤ - ١٦٪ من أزواج القواعد تكون أزواج G:U. بالقرب من منتصف التركيب الثانوى هناك يوجد منطقة تتابعها متناظر جداً تظهر كم منطقة معلبة فى شكل ٢. هناك خيط ممتد طويل من ال polypurine موجود بالقرب من هذه المنطقة المركزية المحفوظة وإن تماثل التناظر يكون عالياً فى النصف جهة اليسار من التركيب الثانوى عنه فى النصف اليمينى. إن النصف اليسارى يكون أقل ثباتاً من ناحية ديناميكية عنه فى النصف اليمينى. وبشكل واضح فإن التركيب الثانوى لهذه الفيرويدات يمكن تقسيمه إلى جزء يسارى والذى يحتاج تتابعات محفوظة مع بعضها البعض إلى حد ما بتركيب لولبى بسبب انخفاض الثبات الديناميكى، والنصف اليمينى، والذى يكون فيه الثبات أكثر أهمية من تتابع النيوكليوتيدات.

بالنسبة لإثنين من الفيروسات فى مجموعة PSTVd، فإن الفيروس PSTVd نفسه والفيروس CEVd هما عزلات مختلفة (طفرات) معروفة بأنها تختلف بواسطة تتابعها وجزئياً بشدة الإصابة مثل التعبير بالأعراض. أما ASBVd، CCCVd فهى تختلف عن بعضها البعض بمقدار ما تختلف عن فيروسات مجموعة PSTVd. فمثلاً ASBVd، CCCVd لا تحتوى على تتابع polypurin. فى CCCVd يوجد منطقة محفوظة مركزية، بينما فى ASBVd يوجد فقط تعاقب مشترك من GAAAC. كذلك فإن هذه الـ GAAAC موجودة فى الفيروسات فى المنطقة المركزية فى التركيب الثانوى. كذلك فإن ASBVd يظهر أقل تناظراً مع الفيروسات الأخرى.

بالإضافة إلى أن CCCVd يختلف عن جميع الفيروسات بسبب أن هناك أربعة تنوعات من CCCVd ذات أطوال مختلفة تكون مترافقة مع مرض كادانج - كادانج فى جزر الهند فهى تسمى:

١ - Small - 1 CCCVd به ٢٤٦ نيوكليتيده وهو عبارة عن تضاعف تماماً فى Small - 2 CCCVd حيث يحوى الأخير ٤٩٢ نيوكليتيده. وهى تحدث فى الأطوار المبكرة من المرض بينما يظهر إثنان من الأحماض النووية RNA متأخراً بعد عدة سنوات من الإصابة.

٢ - Large - 1 CCCVd فيه ٢٨٧ نيوكليتيده.

٣ - Large - 2 CCCVd فيه ٥٧٤ نيوكليتيده.

يختلف CCCVd نوع Large - 1 عن نوع Small - 1 عن نوع فى تضاعف ٤١ نيوكليتيده فى النهاية اليمنى فى التركيب الثانوى وهذا سبب ظهور العزلات Baaو 54. إن حجم المنطقة المضاعفة يختلف بين ٤١ - ٥٥ بين العزلات المختلفة من CCCV.

جدول ٢: التركيب الأولي والثانوي للفيروسات.

الفيروس	النوكليوتيدات				النسب المئوية		أحماض النوكليوتيدات		أشكال القواعد				
	مجموع	A	U	G	C	مجموع	نسبة	نسبة	النسبة	النسبة	النسبة	النسبة	النسبة
PSTVd	٢٥٩	٧٢	٧٧	١٠١	١٠٨	١٠٠	—	—	٧٠	١٢٦	١٣	٥٨	٢٩
PSTVd	٣٥٩	٧٠	٨٠	١٠١	١٠٨	—	٩٩	٢	١	١٢٨	١٣	٥٧	٣٠
PSTVd	٣٥٩	٧٤	٧٧	١٠٠	١٠٨	—	—	٤	٠	١٢٤	١٢	٥٨	٣٠
TPMVd	٣٦٠	٧٢	٨١	٩٩	١٠٨	٨٢	٩٩	—	—	١٢٢	٩	٦٠	٣١
TASVd	٣٦٠	٧٠	٩٠	١٠١	٩٩	٧٢	—	—	—	١٢٦	١١	٥٧	٣٢
A-CEVd	٣٧١	٧٢	٧٥	١١٢	١١٢	٧٢	١٠٠	—	—	١٢٨	١٦	٥٦	٢٨
C-CEVd	٣٧١	٧٢	٧٦	١١٠	١١٢	—	٩٩	٤	٠	١٢٨	١٦	٥٦	٢٨
AM-CEVd	٣٧١	٧٢	٧٦	١١٠	١١٢	—	٩٩	٤	٠	١٢٥	١٦	٥٦	٢٨
DE 25-CEVd	٣٧١	٧١	٧٦	١١٢	١١٢	—	٩٩	٤	٠	١٢٨	١٦	٥٦	٢٨
DB 26-CEVd	٣٧١	٦٩	٨٠	١١٢	١١٠	—	٩٣	٦	٦	١٢٦	١٤	٥٨	٢٨
E-CSVd	٣٥٤	٧٤	٩٢	٩٠	٩٧	٧٢	١٠٠	—	—	١٢٢	١٠	٥٦	٢٤
A-CSVd	٣٥٦	٧٥	٩٢	٨٩	٩٩	٦٩	٩٧	٦	٤	١٢٤	١٣	٥٢	٢٥
HSVd	٢٩٧	٦١	٦٩	٧٩	٨٨	٥٥	١٠٠	—	—	١٠٠	٧	٦٤	٢٩
CPFVd	٣٠٣	٦٤	٧٠	٨١	٨٨	٩٧	٥٥	٨	٧	١٠٥	٤	٦٥	٣١
ASBVd	٢٤٧	٦٨	٨٥	٥١	٤٣	١٨	—	—	—	٨٢	١٤	٣٤	٥١
مصدر 1 - CCCVd	٢٤٧	٥٢	٤٧	٧٢	٧٢	١١	١٠٠	—	—	٨٠	٨	٦٩	٢٤
كبير 54 Bso	٢٨٧	٥٩	٥٨	٨٦	٨٤	—	١٠٠	٠	٤١	٩٢	٨	٦٧	٢٥
Ligao 14 B	٢٩٦	٥٩	٥٩	٩١	٨٧	—	١٠٠	٠	٥٠	٩٦	٨	٦٨	٢٤
Ligao T1	٣٠١	٦٠	٥٩	٩٣	٨٩	—	١٠٠	٠	٥٥	٩٧	٨	٦٨	٢٤
San Nascacio	٢٩٧	٥٩	٥٩	٩١	٨٨	—	١٠٠	٠	٥١	٩٦	٨	٦٨	٢٤

ملاحظات:

١ - يعتبر CPFVd بالنظر إلى تناميته المتناثر تنوع من HSVd.

٢ - 1 - CCCVd المعتبر هو خليط من الأنواع واحد يحوى 197 فى موقع C والآخر يحوى CC

فى ذلك الموقع. وهناك 2 - CCCVd لم يذكر فى الجدول لأنه تضاعف لـ RNAs

المتناثرة.

٣ - جميع عزلات CCCVd1 الكبير تختلف عن عزلة الصغير وذلك بتضاعف التتابع على النهاية اليمنى في التركيب الثانوي وبالتالي يكون تناظر التتابع 2100. إن المنطقة المتضاعفة قد ذكرت تحت بند للمحمة. أما عزلة 54 Baa، Ligoa 14B، Ligoa T1 قد إشتقت من CCCVd1 الصغير مع ٢٤٦ نيوكليوتيدة. أما Aan Nascisco هو مشتق من CCCVd1 الصغير ٢٤٧ نيوكليوتيدة.

٢ - التركيب الثانوي Secondary Structure :

كما ذكر سابقاً فإن التركيب الثانوي للفيروسات قد استنتج من نتائج التجارب بالإضافة إلى الحسابات النظرية. إن التجارب باستعمال المواد الكيماوية المحورة مثل :-

١ - Dye binding.

٢ - Oligonucleotide binding.

٣ - تقدير الروابط الفسفورية (الفسفات ثنائية المجموعة الاسترية) القابلة للمهاجمة بواسطة الانزيمات.

أظهرت بوضوح وجود الخيط المفرد بالإضافة إلى مناطق ثنائية الخيط. وكذلك لقد استنتج أيضاً أن معظم الجزيء يكون قابلاً للتفاعل الاشارى Ligand وغير مغلف بواسطة أى تركيب ثلاثى مؤدياً إلى شكل كروي. وعلى أية حال فإن حقيقة أن المناطق احادية الخيط والحلزونية المزدوجة تكون مرتبة فى نمط أو طريقة تسلسلية بدون تشعب أو تفرع، وهذا يمكن استنتاجه فقط من التقدير الكمي لمنحنيات الذئرة الحرارية للفيروسات.

إن الأصل النظرى للتركيب الثانوى قام وفقاً لثلاثة مستويات:

الأول:- الشكل العصى المتطاوّل للجزئ وهذا كان قد أخذ من نتائج التجارب وبواسطة النظام التجريبي والخطأ، فإن مخططات القاعدة المزدوجة جعلته أقرب ما يكون إلى أعلى رقم من القواعد المزدوجة، ٦٩ مثلاً.

الثاني:- المستوى المائل من التقية. إن الأبحاث الثيرموديناميكية أثبتت وجود التركيب الثانوى للفيرويد.

الثالث:- إن نظام العد العشري والحساب الذى إتبعه كثير من العلماء مثل كل من Nussinov & Jacobson سنة ١٩٧١ و Zuker & Stiegler سنة ١٩٨٠ قد طبقوه فى الحساب الدقيق للتركيب الأقل حفظاً للطاقة. وإن هذا النظام قد أحدث فيه تحسناً وتحوراً لحساب الخيوط الدائرية والقيم الأحدث لأزواج القواعد الثابتة والعروات.

يمكن القول باختصار إن أبسط الطرق للحصول على أقرب ما يمكن من الدقة لأعلى رقم من القواعد المزدوجة وأكثر الحسابات تعقيداً أدت إلى القول بوجود تركيب ثانوى متناظر تقريباً. الاختلافات وجدت فقط فى مناطق محدودة من الجزئ. كما أن تركيبات ثانوية متماثلة جداً حصل عليها أيضاً عندما استعملت مجموعات مختلفة من معلومات الثبات العنصرى. فمثلاً إن التركيب الثانوى للفيرويد PSTVD الذى ذكر بواسطة Riesner et al سنة ١٩٧٩ أو الذى ذكر بواسطة Jacobson سنة ١٩٨٠ كان متوافقاً تماماً. يمكن القول بكل أمان أن تركيب الفيرويد غير غامض ولا عليه التباس وبالتالي حتى التقديرات التقريبية تؤدي إلى التركيب الصحيح. جدول رقم ٣.

جدول رقم ٣: القياسات التيرموديناميكية للتركيب المقطعي للفيرويدات،
الفيروسايدات وتتابعات عشوائية

	$\Delta G/N$ (KJ/mol)	T_m [°C]	$\Delta T_{1/2}$ [°C]	Mechanism
Viroids				
PSTVd	1.67	51	0.9	Formation of stable hairpins
CEVd	1.62	51	1.0	
CSVd	1.61	48.5	1.1	
CCCvd - I- Large	1.53	49.1	1.2	
CCCvd - I- small	1.53	49.1	1.4	not determined
ASBVd	1.13	37.5	1.5	
Virusoids				
SNMV2	1.43	38	2.8	—
VTMoV2	1.32	38	2.0	—
Random sequences	1.27 ± 0.1	36 ± 5	> 5	—

ملاحظات:

في التابع العشوائي عدد النيوكليوتيدات ومنحنيات من G, C, U, A مأخوذة من PSTVd. التابع العشوائي متوسط لخمسة مكررات. T_m و $\Delta T_{1/2}$ قيمها تشير إلى قوة أيونية $0.11, Na^+$ ، رقم حموضة ٦.٨.

٣ - التركيب المقطعي Structural Transitions :

إن التراكييب المقطعية للفيرويدات قد درست بعدة طرق منها: -

أ - منحنيات الذئرة بالحرارة.

ب - طرق قياس الحرارة الدقيقة.

جـ - الطرق الديناميكية.

د - طرق الارتفاعات المفاجئة لدرجات الحرارة.

إن منحنيات التفكك سواء التي حصلت بواسطة hypochromicity - UV أو بواسطة الاختلافات الحرارية، تظهر مقطع رئيسي ضيق على حوالى ٥٠م في ١١,٠ أيون صوديوم Na^+ ودرجة حموضة (6.8) pH. كذلك فإن درجة حرارة النقطة الوسطى T_m تكون أقل بحوالى ٢٠م عن قيمة ال T_m للحمض DNA ثنائى الخيط وأقل بحوالى ٣٠م عن الحمض RNA ثنائى الشريط عند مقارنة كليهما بمحتوياتهما من GC. إن قيمة T_m لمعظم أنواع الفيروسات تتراوح ما بين ٥١ - ٣٦م. أما قيمتها لمنتصف العروض لمعظم التراكيب المقطعية للفيروسات هي $\Delta T_{1/2}$ تتراوح ما بين ٩,٠ إلى ٥,٠م. إن متوسط الطاقات الحرة لكل نيوكليوتيد $\Delta G/N$ يتراوح ما بين ٦٧,١ إلى ٢٧,١ كيلو جول (KJ) لكل مول. إن مقطع واحد أو اثنين من ذات ال hypochromicity المنخفض وذات $\Delta T_{1/2}$ قد لوحظت على درجة حرارة ١٠ - ٢٠م اعلى من المقطع الرئيسى. فى المقطع الرئيسى عال التعاون فإن جميع ازواج القواعد فى التركيب الطبيعى تتفكك وتكون قطع متكاملة تكون فى أجزاء متباعدة من التركيب الطبيعى تعود تتحد ثانية لتكون شكل دبوس الشعر الأكثر ثباتاً. فى درجات الحرارة العالية فإن دبائيس الشعر هذه يحدث لها دنثرة على شكل مقاطع أو أشكال حرارية منفصلة. ولقد لوحظت هذه الأشكال فى Electron micrographs. لقد وجدت دبائيس الشعر الثابتة فى التجارب على درجات الحرارة العالية. يجب أن نذكر أن دبوس الشعر رقم I موجود فى المنطقة المحفوظة جيداً.

إن شكل رقم ٣ يوضح أشكال دبائيس الشعر فى بعض الفيروسات.

إن طريقة اعادة الترتيب لشكل الفيروس من التركيب المتطاوّل الطبيعى إلى تركيب مدتر جزئياً مع تكوين أشكال دبوس الشعر جديدة لوحظت أول مرة

بالتجارب. نفس الميكانيكية يمكن الحصول عليها نظرياً بدون إفتراض سابق عن التركيب الثانوى. إن الحسابات التى إتبعها العالم Nussinov سنة ١٩٨١ قد استعملت على درجات حرارة مختلفة وأظهرت أن الشكل المتحصل عليه يمكن أن يلتوى وبأخذ شكل ضيق يتراوح ما بين الشكل المطاول إلى الشكل المتفرع وأن الشكل الرئيسى يسهل عليه القيام بهذه الأشكال إلى حد كبير. وإن الحسابات قد أظهرت أن الدنترة تبدأ فى النصف اليسارى من التركيب الثانوى. هناك منطقتان حيث يكون التركيب الثانوى أكثر قابلية للتغير هما منطقة البولى بوريين الأكثر قابلية للمط polypurine stretch والمنطقة المجاورة إلى الجانب اليسارى من المنطقة المحفوظة. هاتان النقطتان الضعيفتان فى التركيب تقريباً متمثلتان فى الفيرويدات CSVd، CEVd، PSTVd.

Viruses	-Hairpins-		
	I	II	III
PSTVd	<p>79 87 CCUCUAGG GCGAGGCC 110 102</p> <p>14</p>	<p>227 238 CCCUGCCCC GAGAGCGGG 328 319</p> <p>82</p>	<p>127 135 CCGUGGGGA GCGGCCU 168 160</p> <p>28</p>
CEVd	{possible but not studied}	<p>230 251 CCCUGCCCCGAG GAGAGCGGCCUC 339 327</p> <p>79</p>	not possible
CSVd	{possible but not studied}	<p>223 233 CCCUGCCCCG GAGAGCGGCC 322 312</p> <p>76</p>	not possible
CCCVd1-large	<p>45 54 CCUCUAGG GCGAGGCC 77 69</p> <p>14</p>	not possible	not possible

شكل رقم ٣ :

دبابيس الشمر لأربعة فيرويدات. العدد يدل على منطقة القواعد المزدوجة والرقم فى الدائرة يدل على حجم العروة. يلاحظ دبوس الشمر رقم ٣ لا يوجد إلا فى الفيرويد PSTVd.

الوزن الجزيئي والشكل Molecular Weight and shape :

إن الأوزان الجزيئية قد حددت أصلاً من ١ - الهجرة الكهربائية في الجيل. ٢ - Sucrose gradient ٣ - Electron micrographs. إن أولى الأوزان الجزيئية الدقيقة (الصحيحة) قد حصل عليها باستعمال آلة الطرد عن المركز فائقة السرعة ثم بعد ذلك يتم إجراء توازن على الترسبات بطرق معينة. ونظراً لأن تتابع تركيب الفيروسات معروف الآن، فإن معظم الأوزان الدقيقة يمكن حسابها من هذا التتابع. يمكن الحصول على قيم جيدة بمعدل وزن جزيئي ٣٣٣ لكل نيوكليوتيد تشمل Bound cations.

أما بالنسبة للشكل، فتظهر الفيروسات في الصور المأخوذة بواسطة Electron micrographs على شكل تركيب عصوي إذا ما حضرت تحت ظروف طبيعية (١). مول كلوريد صوديوم و pH 7. هذه النتيجة معروفة بالنسبة لكثير من الفيروسات مثل PSTVd، CPFD، CCCVd، CSVd و HCVd. كذلك أيضاً من دراسات سرعة الترسب على فيروس PSTVd والأشكال الأربعة لفيروس CCCVd، أمكن الاستنتاج بأن الفيروسات تمتلك تركيب شبه عصوي في المحلول، زيادة على ذلك فإنها تأخذ في المحلول بعض المرونة التي تجعل شكلها شبه دائري والتي يمكن تمييزها أيضاً بوجود مسافة قصيرة تتكرر في الفيروس، هذا الطول المتكرر يكون تقريباً نصف قطر الدائرة التي يمكن أن ينحنى إليه البوليمر، هذا الطول يساوي ٣٠٠ أنجستروم. وعند إجراء مقارنة بين هذا الطول والطول المتكرر في حمض DNA ثنائي الشريط فيكون ٦٠٠ أنجستروم، يعني الضعف تقريباً. إن هذا الطول ليس له علاقة بطول الفيروس نفسه لأن طول الفيروس لا يتجاوز ٥٠ نانوميتر.

نتيجة التحليل بطريقة Sedimentation coefficient أمكن الاستنتاج بأنه حتى في الأشكال المضاعفة من CCCVd والتي تسمى RNA2 فإنها تتخذ في المحلول الشكل المتطاوّل. العالم Haseloff et al سنة ١٩٨٢ استنتج بدراسته على أساس

التتابع فى النيوكليوتيدات أن الفيرويدات تأخذ الشكل المتطاول بالإضافة إلى الشكل الصليبي.

يمكن القول بأن الفيرويد يأخذ الشكل المتطاول ذو الانتفاخات فى النهايتين ويتكون عروات بين هذين الانتفاخين، بالإضافة إلى حدوث إنثناءات التى تشكل ما يسمى دبوس الشعر.

هناك وصف آخر لشكل الفيرويد يذكره Agrios سنة ١٩٨٧ يقول فيه تظهر الفيرويدات على شكل جزيئات دائرية من RNA وحيد الخيط بأزواج عديدة من القواعد فى أجزاء هذا الخيط، تؤدى أزواج القواعد هذه إلى ظهور بعض أنواع تركيبات تشبه دبوس الشعر بخيط مفرد ومناطق مزدوجة الخيط على نفس الفيرويد.

مع أن الفيرويدات تمتلك كثيراً من صفات الأحماض النووية RNAs المفردة الخيط، إلا أنه عندما تفحص بالميكروسكوب الالكترونى تظهر بطول حوالى ٥٠ نانوميتر ولها سمك الخيط المزدوج من الحمض النووى DNA.

ولقد ذكر Maramorosch فى كتابه سنة ١٩٩١ «قال» تتخذ جزيئات الفيرويد غير المدنترة كثير من أزواج القواعد الداخلية بحيث تكون هذه الأزواج مرتبطة لتعطى تركيب شبه عصى بطول ٥٠ نانوميتر، أما عند دنترة هذه الجزيئات فإنها تغطى دوائر احادية الشريط يكون طول محيطها ١٠٠ نانوميتر. أما الوزن الجزيئى يساوى $(80 - 122) \times 10^3$ أما $S_{20w} = 8 - 10$ أما Tm فى ١٠ مللى مول أيون صوديوم $= 50^\circ \text{م}$. أما الكثافة فى كبريتات السيزيوم تساوى تقريباً ١,٦ غم / سم^٣.

أما الصفات الكيماوية فذكر أن الفيرويدات تتكون من ٢٤٦ - ٣٧٠ نيوكليوتيدة. كل الفيرويدات باستثناء ASBVd غنية بأزواج القواعد G:C بالمنطقة المحفوظة المركزية إن ال oligomers عندها الكفاءة لتشكيل تركيبات بلاندرميه

(من الأمام تشبه التركيب من الخلف) تشمل الجزء العلوى من المنطقة المحفوظة المركزية. إن الفيروسات ليس لها القدرة على أن تشفر للبروتين.

تناسخ (تضاعف) الفيروسات

VIROIDS REPLICATION

إن تضاعف الفيروس من ناحية نظرية يشمل النسخ إما عن قالب RNA أو DNA. إن ميكانيكية RNA الموجه تتطلب وجود تتابع مكمل للحمض RNA فى الفيروس الكامل فى النسيج المصاب، بالإضافة إلى وجود أنزيمات مسبقة فى العائل مع أنزيم RNA - polymerase المتخصص للحمض RNA الموجه.

أما ميكانيكية توجيه DNA فإنها تتطلب أيضاً وجود تتابعات مكاملة للحمض DNA للفيروس الكامل. هذه التتابعات للحمض DNA يمكن أن تكون موجودة مسبقاً - بشكل مثبط - فى العوائل غير المصابة أو أنها يمكن أن تصنع نتيجة للإصابة بالفيروس، وفى هذه الحالة فإن أنزيمات العائل الموجودة مسبقاً مع أنزيم RNA - polymerase المتخصص للحمض RNA الموجه أيضاً تكون ضرورية الوجود.

هل يحدث تضاعف لـ RNA أو DNA الموجه:

هناك أبحاث قديمة فى أوائل السبعينات ذكرت أن التضاعف يحدث فى كلا الحمضين RNA و DNA، إلا أنه تبين واضحاً أن تضاعف الفيروس يحدث على قالب من RNA وليس من DNA، وإن الفيروس الداخلى هو الذى يعمل كقالب لبناء ذرية جديدة من الفيروس وليس DNA الخاص بالعائل.

ولكى نميز بين تضاعف RNA أو DNA الموجه، فإنه تأثيرات بعض مركبات المضادات الحيوية على تضاعف الفيروس قد درست جيداً. فى الدراسة على الطبيعة كانت تؤخذ شرائح من ورقة نبات سليم وأخرى مصابة بفيروس PSTVd وكانت

تعامل بالماء أو بـ Actinomycin - D، وجد أن تضاعف الفيروس كان حساساً للمثبت الذى يثبط بناء RNA من DNA الموجه وهذا وجده العالم Diener سنة ١٩٧٥. وحصل على مثل هذه النتائج فى الدراسة المعملية على نظام بناء RNA والذى فيه كانت تؤخذ أنوية الخلايا من النباتات السليمة أو المصابة بالفيروس PSTVd من نباتات الطماطم وتنقى جيداً وتستعمل كمصدر للانزيم.

إن حساسية تضاعف الفيروس لمادة Actinomycin - D قد تأكدت فى دراسة قام بها العالم Muhlbach سنة ١٩٧٩ وذلك على فيروس الثمرة الباهتة فى الخيار (CPFVd) الذى يبنى فى البروتوبلاست المعزول من أوراق الطماطم. فى نفس هذه الدراسة فإن تأثير amanitine - α على بناء الفيروس قد تميزت تماماً. إن وجود مادة amanitine - α بتركيز 10^{-1} - 10^{-8} مول بين الخلايا يكون كافياً لتثبيط أنزيم RNA polymerase II (الذى يختص بنسخ سلاسل جزيئات RNA المراسل mRNA) على DNA الموجه فى نباتات الطماطم، إلا أنه لا يثبط أنزيم RNA polymerase III (الذى يقوم ببناء عدد من سلاسل RNA القصيرة الناقل tRNA و rRNA) وبالتالي لا يثبط تضاعف الفيروس CPFVd. وعلى النقيض من الدراسات التى أجريت باستعمال Actinomycin - D التى استعمل فيها amanitine - α والذى فيها يكون تأثير هذا المركب على بناء الفيروس ذو نتيجة غير متوقعة ليس بتثبيط نوعى لبناء RNA من DNA الموجه، ولكن تأثير سام كلى على البناء الحيوى، وأن التأثير المثبط لمادة amanitine - α ليس من المحتمل أن يكون بسبب عدم التخصص النوعى ولكن بسبب التأثيرات الثانوية للمركب على ميتابولزم الخلية. إن هذا الملخص قد تأكد بالتقارير التى بينت أن تركيز مادة α amanitine بين الخلايا الكاف لتثبيط تضاعف الفيروس بحوالى ٧٥٪ لم يكن له تأثير ملحوظ على البناء الحيوى لكل من RNA لفيرس موزايك الدخان أو أنواع RNA الخلوية مثل tRNA، 5S RNA، 7S RNA و rRNA.

هناك بعض الدراسات تبين أن بناء RNA من DNA الموجه هو الداخلى فى

تضاعف الفيرويد وهذا يكون أكثر وضوحاً بالتجارب التي يستعمل فيها aman- α -itine، هذه النتائج التي لم توافق تلك المتحصل عليها باستعمال Actinomycin-D فقط ولكن بالإضافة إلى استعمال أنزيم نوعي والذي يسمى RNA polymerase II الذي يعمل على DNA.

إن هذه النتائج أدت إلى القول بثقة أن أنزيم polymerase II يكون داخلياً مباشرة أو غير مباشر في تناسخ الفيرويد. زيادة على ذلك فإن الاعتماد في بناء CEVd على أجزاء النواة في النبات *Gynura aurantiaca* وعلى التركيز الأيوني مثل Mg^{2+} ، Mn^{2+} ، $(NH_4)_2SO_4$ مستوى خط بناء CEVd حتى على تركيز عال من amanitine α - 10^{-8} - 10^{-6} مول يمكن إعتبار تشارك RNA polymerase رقم I و III.

إن إمكانية تناسخ الفيرويد بواسطة polymerase II قد دعمت بالدراسات المعملية باستعمال أنزيم RNA polymerase II نقي من نسيج طماطم سليمة أو من جنين قمح. ولقد تبين أنه بوجود أيونات Mn^{2+} فإن الأنزيم ينسخ RNA الفيرويدي إلى خيوط مستقيمة سالبة ذات طول كامل وأن هذا الفيرويد يكون مقبولاً لأن يكون قالب ذو كفاءة عالية بالمقارنة مع RNA الطبيعي أو المبنى. زيادة على ذلك أنه خلال بناء الوسيطات للطول المعين فإنه يتجمع، هذا يدل على إفتراض واضح في ادخاله في المعمل. ولقد ذكر أن أيونات Mn^{2+} والتي عادة تخفض تخصص القالب لانزيم البولي ميريز polymerase لا يحتاج إليها هنا (وأن الفيرويدات) حتى إذا قورنت مع الفيروسايدات تظهر درجة أعلى في الأهمية لنشاط القالب.

في تجارب التحليل بواسطة آلة الطرز عن المركز فائقة السرعة، فإن الارتباط الثابت بين polymerase II من جنين القمح والفيرويد PSTVd وجد أنه $710 M^{-1}$. إن هذا الرقم منخفضاً بالمقارنة مع ارتباط محفز ال polymerase، ولكن حوالي درجة أعلى من التكبير منه في ارتباط ال polymerase إلى أحماض نووي RNAs طبيعية شاملة الفيروسايدات. في التصوير الإلكتروني Electron micrographs لقد

تبين أن RNA polymerase II من جنين القمح يمكن أن يرتبط من كلتا النهايتين لفيروس PSTVd التركيب الثانوي.

إن الحقيقة التي تقول بأن الفيروسات من الممكن أنها تستطيع أيضاً أن تنسخ في الطبيعة بواسطة أنزيم العائل RNA polymerase II والذي عادة يقبل العمل على الـ DNA ثنائي الخيط كقالب، يمكن أن تؤدي إلى الاقتراح بأن الفيروسات تكون أخطاء في الخلية لقطع من الـ DNA. هذا يمكن أن يعكس التركيب الاستثنائي والصفات الديناميكية للفيروسات والتي قد وصفت سابقاً بأنها شبيهة بـ DNA.

في المعمل فإن النسخ للحمض RNA للفيروس PSTVd إلى نسخ كاملة الطول بواسطة أنزيم RNA polymerase المعتمد على RNA من نسيج ورقة سليمة قد ذكرت أيضاً. هذا الأنزيم يكون بوضوح مرشح لتناسخ RNA الفيروسي للنبات. لا يكون تناسخ الفيروس في المعمل مثبطاً بواسطة amanitine - ٥٠. وبالتالي فإن هذه النتائج سوف لا تشرح الحساسية في الطبيعة لمادة amanitine - ٥٠ لبناء الفيروس الملاحظة في البروتوبلاست.

الانزيمات الداخلة في تضاعف الفيروس Enzymes Involved :

لقد أظهر العالم Rackwitz سنة ١٩٨١ أن أنزيم RNA polymerase II (الذي يعمل على DNA الموجه) المأخوذ من جنين القمح أو من خلايا كالوس أو أوراق خضراء من أنواع طماطم برية *Lycopersicon peruvianum* تكون قادرة في المعمل على نسخ العديد من قوالب RNA طبعياً وتخليقياً، مع أنه على كفاءة أقل بمقدار الضعف من كفاءة قوالب الـ DNA، ولقد أظهر الباحث أنه في جميع قوالب الـ RNA الطبيعية المختبرة، فإن الفيروسات تنسخ بكفاءة عالية بواسطة أى أنزيم. إن التحليل بواسطة الهجرة الكهربائية في الجيل تحت ظروف الدنترة في منتجات النسخ في المعمل مع فيروسات منقاة تستعمل كقوالب كشفت بالإضافة إلى عدد من الجزيئات المكمل للفيروسات الصغيرة.

باعتبار كل النتائج السابقة نستنتج أن الفيروسات تتضاعف بطريقة غريبة والتي فيها تكون جزيئات RNA المعدى منسوخة كلية بواسطة أنزيم العائل الموجود سابقاً، وبالتالي فإن هذا الأنزيم يكون عادة RNA polymerase II لحمض DNA الموجه. يبدو واضحاً أن الأنزيم المسئول عن بناء حمض mRNA الموجود مسبقاً تحت ظروف معينة يمكن أن يعمل كأنزيم polymerase أو RNA replicase للحمض RNA الموجه. إن هذا يكون حائثاً على التأمل بأن التركيب الطبيعي للفيروسات يكون عبارة عن تركيب يشبه DNA ثنائي الشريط والذي يسمح للأزيمات أن تقوم بعملها بشكل جيد نسبياً بهذه الكفاءة. لقد تبين أن الفيروسات يمكنها بسهولة أن تشكل معقدات ثنائية مع RNA polymerase II والتي تشترك (تنافس) مع DNA لعمل قالب لمواقع الربط على الأنزيم، وبالتالي فإنها تثبط وبشدة بناء RNA من DNA الموجه. من هذه الناحية فإن جزيئات الفيروس المعدية تتحد وتجرى RNA polymerase II الموجود في النواة لتكاثرها الخاص. بالتالي يمكن اعتبار الفيروسات بأنها أحماض نووية RNA أنانية (هذا ما قاله Lewin سنة ١٩٨١).

لغاية الآن لا يوجد تقارير على بناء الفيروس باستعمال RNA polymerase رقم I أو III المعتمد على DNA النقي، وبالتالي لا يمكن اعتبارها داخلة في تضاعف الفيروس. إن موقع الفيروسات الناضجة في النواة سوف تظهر لصالح polymerase I الذي عادة يجرى تناسخ RNA الرايبوسومي في النواة. إن تماثل التتابع بين تتابع محفز DNA من كائن حي آخر مع التتابعات على النهاية اليمنى في التركيب الثانوى للفيروس PSTVd، CSVd أو CEVd قد وجد بواسطة كثير من الباحثين. ومن ناحية أخرى فإن موقع الفيروسات الناضجة في النواة لا يستثنى بناءها بواسطة الأنزيم polymerase II والذي يعرف بأنه موجود في البلازما النووية أو مترافقاً مع الكروماتين. هذا يمكن أن يكون متوقعاً من المقارنة مع الحمض النووى الصغير U٥ والذي على الأقل في الخلايا الحيوانية ينسخ بواسطة polymerase II من الكروماتين وبعد ذلك يصبح مترافقاً مع النواة.

المقنبات : Probes

هناك طريقة أخرى لدراسة تناسخ الفيرويد تكمن في تطوير المقنبات أو جزيئات من المقنبات الخاصة بالفيرويد وتعريف تتابع القواعد في DNA أو RNA المتعلق بالفيرويد قياساً على الحمض النووي المستخلص من النباتات وذلك بواسطة التهجين الجزيئي.

لقد استعملت ثلاثة أنواع من المقنبات هي :-

١ - فيرويدات نقية معلمة في المعمل باليود المشع ١٢٥ .

٢ - خيط مفرد (محضر في المعمل) من DNA تكميلي للفيرويد (cDNA).

٣ - خيط مزدوج من الفيرويد ومكمله من ال DNA يحصل عليه بطرق فنية معينة.

في البداية يمكن القول بأن استعمال الفيرويدات المعاملة باليود المشع ١٢٥ كمقنبات في تجارب التهجين أدى إلى نتائج متضاربة. على أساس مثل هذه التجارب فإن مجموعتين من الأبحاث قد ذكرتا وجود تعاقب مكمل للفيرويد في DNA الفيرويد المعدى وحتى في نباتات العائل غير المصابة، لكن الأبحاث اللاحقة أثبتت بوضوح خطأ النتائج السابقة. وبالمثل فإنه في تجارب التهجين الجزيئي بين cDNA المعلم بالفسفور المشع ٣٢ وفيرويد تقزم الاقحوان CSVd فإن ال Genomes سواء في العوائل السليمة أو المصابة بفيرويد CSVd لم يلاحظ فيها تطابق في ترتيب وتعاقب النيوكليوتيدات.

وعلى أية حال فإن أى من هذه التجارب لم تستبعد إمكانية أن التتابعات المتعلقة بالفيرويد قد تكون موجودة عشوائياً على كروموزومات العائل أو أن ال DNA للعائل يحتوى على مجموعة صغيرة فقط من جينوم PSTVd. وفي هذه الحالة الأخيرة فإنه من الممكن تصور أن هناك ترتيب قصير من قواعد ال DNA المكاملة للفيرويد قد تقوم بعملها كمواقع تمييز وقد تتدخل في تولد المرض بواسطة

الفيروس. إنه من الواضح على أية حال أن أى من مثل هذه التفاعلات من DNA المتعلقة بالفيروس لا يمكن أن تعمل كقوالب لبناء أفراد جدد من الفيروسات، ويصبح بالضرورة أن الفيروسات يجب أن تتناسخ عن قوالب RNA. وإن هذا التقرير الأخير قد دعم بعدة ملاحظات تدل على أن التركيب الرئيسى للفيروس لا يتغير بغض النظر عن العائل الذى يتناسخ فيه، وكما هو متوقع من أن الفيروس الداخلى هو الذى يعمل كقالب لبناء ذرية جديدة من الفيروس وليس DNA الخاص بالعائل.

المركبات الوسيطة فى تناسخ الفيروس:

Intermediates of Viroid Replication

إن أكثر البراهين إقناعاً على أن RNA الموجه هو المسئول الرئيسى عن ميكانيكية تضاعف الفيروس تكمن فى النتائج التى حصل عليها عدة مجموعات من الباحثين بأن جزيئات RNA المكمل للفيروس تتكون فى مستخلصات أحماض نووية من نباتات مصابة ولا تتكون فى مستخلصات الأحماض النووية من النباتات غير المصابة. ويبدو واضحاً أن مثل هذه الجزيئات تمثل مركبات وسيطة فى عملية تناسخ الفيروس. إن تعاقب RNA المكمل للفيروس أمكن التعرف عليه لأول مرة فى مستخلصات من نباتات طماطم مصابة بفيروس CEVd وأوراق نبات *Gynura aurantifolia* بواسطة التهجين فى المحلول بمنقب فيروس معلم بيود مشع ١٢٥. كما أن بعض الأحماض النووية RNAs المكمل للفيروس أمكن التعرف عليها فى الأجزاء الطافية من كلوريد الليثيوم، ولكن الغالبية العظمى كانت فى الأجزاء المترسبة من كلوريد الليثيوم. لقد ذكر العالم Grill سنة ١٩٧٨ أن RNA المكمل للفيروس يكون مرافقاً لـ DNA العائل يكون على شكل جزيئات RF (شكل تناسخى) RI (وسيط التناسخ) وكذلك مرافقاً لجزيئات تكثر فيها مناطق ذات خيط واحد وأخرى طويلة ذات مناطق ثنائية الخيط واحادية الخيط وأخرى على شكل بلمرة بالإضافة إلى تجمعات أو كتلات ذات وزن جزيئى عال من الجزيئات المكمل للفيروس، إلا أن الباحث Grill سنة ١٩٨٠ لم يوافق على مثل هذه التصنيفات.

إذا فرض أن الأحماض النووية RNAs المكملة للفيرويد تقوم كقالب ينسخ عنه فيرويدات جديدة فمن الواضح أنها يجب أن تحتوى على تعاقب كامل مكمل للفيرويد، هذا يعنى أنها يجب أن تكون مساوية فى الطول أو أطول من الفيرويد. ونظراً للطريقة غير السليمة التى إتبعها العالم Grill سنة ١٩٨٠ فى تحديد أحجام مكملات الفيرويد لفيرويد CEVd فإنه لم يصل إلى نتيجة فى تحديد حجم مكملات الفيرويد. ويعود الخطأ فى طريقة Grill إلى أنه استعمل RNA غير مدنتر قبل التحليل وكانت تجرى عملية الفصل الكهربائى على الجيل تحت ظروف غير مدنترة.

إن الدليل المقنع لوجود جزيئات كاملة الطول من RNA مكمل للفيرويد حصل عليه بواسطة كل من Owens و Cress سنة ١٩٨٠ فى تجارب-Blot hybridization التى فيها يستعمل خيط مزدوج من DNA معاد تركيبه كمنقب خاص للفيرويد. إن هذا المنقب قد تم بناؤه عن طريق تخضين polyadenylated PSTVd مع أنزيم النسخ العكسى ويتبع ذلك إزالة قالب الفيرويد بالتسخين. كانت النتائج بأن الشريط المفرد من DNA (الذى هو cDNA تكملى لفيرويد PSTVd) قد إنقلب إلى cDNA ثنائى الخيط مقاوم لأنزيم S1 nuclease فى تفاعل استعمل فيه أنزيم 1 DNA polymerase *E. coli*. إن cDNA الثنائى الشريط المكمل للفيرويد PSTVd بعدئذ قد غرس فى pst I فى مواقع أنزيمات القطع الداخلية للبلازم PBR 322 عن طريق استعمال إجراءات تعاقبات Oligo (dc) و Oligo (dg). إن المقاومة للتراسيكليين، تحول الحساسية للينسلين، تحتوى على تتابعات مكملة لـ cDNA الفيرويدى PSTVd المعلم بالفسفور المشع ٣٢ وكلون واحد أعيد تركيبه (29 - pDc) يحتوى ٤٦٠ زوج من القواعد المغروسة فيه. إن هذا الحمض ثنائى الخيط PSTVd cDNA يحتوى مواقع للتقسيم لسته مواقع محددة لانزيمات القطع الداخلى مؤكدة بالتتابع المذكور سابقاً للفيرويد PSTVd. إن نتائج هذه التجارب وغيرها تدل على أن كل التعاقب الكامل للفيرويد PSTVd قد حصل لها كلونة.

إن تجارب التهجين بواسطة بعض المنقبات أثبتت وجود جزيئات RNA فى مستخلصات من خلايا مصابة لها نفس قابلية التحرك (وزن جزيئى محتمل) كما فى فيروس PSTVd المستقيم ولكن ذو قطبيه عكسية. إن جزيئات RNA المكملة للفيروس PSTVd التى لها نفس هذا الحجم قد وجدت بعد معاملة مستخلصات الحمض النووى بأنزيم RNase، دنتره الأحماض النووية RNAs باستعمال الحرارة لمدة دقيقتين على درجة حرارة ١٠٠م فى ٥٠٪ Formamide ثم تبرد وبعد ذلك تخلل بالهجرة الكهربائية بالجيل على درجة ٥٥م فى وجود ٨ مول يوريا. إلا أن العالم Branch ومرافقوه سنة ١٩٨١ قد ذكروا نتائج تخالف هذه النتائج حيث استعمالاً أحماض نووية RNAs مدنترة قبل التحليل وإن التحليل بواسطة الجيل كان يفضل تحت ظروف يعرف أنها تمنع إعادة التقوية الكبيرة للحمض RNA.

وعلى العكس من ذلك فإن نتائج التجارب التى أجريت على فيروس CEBd، فإن cPSTVd كان موجوداً دائماً على وجه الحصر فى الأجزاء الطافية من كلوريد الليثيوم (وزن جزيئى منخفض وخيط ثنائى)، وكذلك فإن النتائج أكدت أن معظم إن لم يكن كل cPSTVd كان موجوداً فى مستخلصات الحمض النووى فى شكل جزيئات مزدوجة مقاومة لأنزيم RNase، هذا يعنى قاعدة مزدوجة مع PSTVd. هذا أمكن تفسيره بواسطة الملاحظات التى تدل على أن إنتاج cPSTVd لم يخف بشل كاف إذا أزيلت تقوية RNA - RNA قبل المعاملة بأنزيم RNase.

ولقد أورد بعض الباحثين عدة براهين تثبت أن الخلايا المصابة بالفيروس تحتوى بالإضافة إلى خيط مكمل للفيروس كامل الطول تحتوى على جزيئات خاصة بالفيروس أطول من وحدة الفيروس الواحدة. إن أول إقتراح يدل على أن مثل هذه الأحماض النووية RNAs القرية من الفيروس يمكن أن توجد فى الخلية حصل عليه بواسطة إختبارات Blot hybridization مع مستخلصات حمض نووى من النباتات المصابة بالفيروس PSTVd، والتى فيها نوعين من RNA يحتوى على

مكمل للفيريود cPSTVd لوحظ أن هجرتهما أكثر بطلاً من هجرة PSTVd. هذا ما ذكره Hadidi سنة ١٩٨١.

إن جزيئات RNA الخاصة بالفيريود PSTVd تكون ذات حركة أثناء الهجرة الكهربائية أكثر بطلاً من جزيئات الفيريود PSTVd الدائرية والمستقيمة، هذا ما لوحظ في بعض الدراسات والتي فيها استعمل مستخلص حمض نووي من نباتات مصابة بالفيريود PSTVd والتي استعمل فيها الهجرة الكهربائية على الجيل والتي فيها كانت الجزيئات الخاصة بالفيريود قد عرفت بواسطة طريقة التهجين Northern bolt التي استعمل فيها منقيات معلمة إما بيود مشع ١٢٥ مع PSTVd أو فسفور مشع ٣٢ مع cDNA. لقد لوحظ سبعة أنواع من cPSTVd، ستة منها تحركت في الهجرة الكهربائية أكثر بطلاً من الفيريود PSTVd الدائري والآخر تحرك تقريباً بنفس سرعة PSTVd الخطي، إلا أن هذه التجارب قد إنتقدها Hadidi سنة ١٩٨١ وأثبت علم دقتها.

إن البرهان المقنع على وجود جزيئات من cPSTVd ذات طول أطول من وحدة الطول قد حصل عليه في دراسة مشابهة لطريقة Blot hybridization والتي فيها استعمل نظامين من الدنترة الكاملة في الجيل. لقد ظهرت وعرفت أربعة حزم متميزة من جزيئات cPSTVd. وباستعمال حسابات معينة تبين أن هذه الحزم تحتوي أطوال ٧٠٠، ١٠٥٠، ١٥٠٠ و ١٨٠٠ نيوكليتيده وهذا أدى إلى القول بأنها تمثل مرادفات للفيريود PSTVd والتي تحتوي ٧١٨ قاعدة (ثنائي)، ١٠٧٧ قاعدة (ثلاثي)، ١٤٣٦ قاعدة رباعي، ١٧٩٥ قاعدة خماسي. لم يمكن التعرف على حزم لوحدة الطول من cPSTVd، قد يكون هذا بسبب التداخل في التهجين بكميات كبيرة من PSTVd غير المعلمة الموجودة في RNA من النباتات المصابة متحركة إلى نفس الموقع في الجيل كما في cPSTVd الاحادى. إن الدراسات الأنزيمية دلت على أن حزم cPSTVd تتكون على وجه الحصر من RNA موجود في معقدات محتوية على مناطق ذات خيط مضاعف. وبسبب التعريف الجيد للحزمة من cPSTVd فقد تبين أن حوالى ٤٠ نيوكليتيده تكون زيادة في طول

الوحدة الواحدة من PSTVd أمكن ملاحظتها بعد المعاملة بأنزيم RNase T₁، كذلك فلقد إقترح الباحث أن هناك كمية قليلة من RNA الداخلة في cPSTVd، يبدو أنها مكونة من مناطق ذات وحدات طول ثنائية الخيط محاطة جانبياً بمناطق احادية الخيط ويبدو أن هذه المناطق الأخيرة تتكون من تتابعات مقاومة لـ RNase T₁.

وبناء على النتائج السابقة فإن الباحثين إفترضوا أن الحزم التى هى أطول من وحدة الطول الواحدة من cPSTVd تلعب دوراً فى تناسخ الفيرويد وأن معقدات cPSTVd تحتوى مناطق ثنائية الخيط من طول PSTVd تمثل مركبات وسيطية فى التناسخ تدخل فى تركيب حزم cPSTVd بطول تقريباً يساوى طول الفيرويد مكرراً ترادفياً وأن حزم PSTVd الموجودة فى هذه المعقدات تكون مساوية لطول الوحدة الواحدة من الفيرويد. إن هذه الفرضيات بالإضافة إلى الاقتراح بميكانيكية تناسخ الفيرويد بطريقة الدائرة الملتفة كلها كانت إفتراضات أمكن إثباتها وستتكلم عنها فيما بعد.

هناك أبحاثاً أخرى وهى أيضاً مبنية على الفصل بالتفريد الكهربائى فى الجيل للأحماض النووية RNAs تكون متبوعة بعملية Blot hybridization أثبتت أن التركيب الجزيئى للجزيئات الخاصة بالفيرويد كانت أكثر وضوحاً وإن بعض الأدلة قد أثبتت أن هذه التركيبات هى فعلاً قد تمثل مركبات وسيطية فى تناسخ الفيرويد.

بالانفاق مع الأبحاث السابقة فإن تجارب Blot hybridization المستعملة منقبات DNA أعيد تركيبها أظهرت أن معظم مكونات الفيرويد هى RNA ثنائى الخيط (وذلك باستعمال مستخلصات RNA من نسيج مصاب) والتي تهاجر فى الجيل أكثر ببطءاً من الوحدة الكاملة من PSTVd. إن أكثر الأحماض النووية RNAs شهرة والتي هى أكثر ببطءاً فى الهجرة هما حمضان قد فصل كل منهما عن الآخر بواسطة الكروماتوغرافى السيلولوزية والهجرة الكهربائية فى الجيل، وإن

التركيب والحجم والشكل ومكونات PSTVd و cPSTVd لكل منهما قد تحللت فى نظام الجيل والذى لا يحدث دنتره للحمض RNA ثنائى الخيط، ولكن يمنع إعادة التقوية والتركيب للأحماض RNAs المدنترة مسبقاً. إن هذا النظام من الجيل له فوائد أخرى فى فصل الجزيئات الدائرية عن الجزيئات المستقيمة فى PSTVd. إن المكونات ثنائية الخيط المعاملة وغير المعاملة بأنزيم RNase قد حلت بهذا النظام مع أو بدون الدنتره المسبقة. لقد أظهرت نتائج هذه التحليلات أن هناك مركبان كبيران هما أحماض نووية RNAs ثنائية الخيط خاصة بالفيروس ودها جر ببطء ذات تركيب قريب الصلة وأنها تتكون من حزم ذات وحدة طول دائرية وخطية وذات قطبية تشبه PSTVd مختلطة مع حزم RNA أطول من وحدة الطول للفيروس وعكسية القطبية.

بعد ذلك أجريت تجارب عديدة كانت نتائجها قد بددت السر الذى كان يحيط بميكانيكية تناسخ الفيروس، وبالرغم من أن هناك إختلافاً فى تفصيل تلك النتائج، إلا أنها كانت تكمل كل منها الأخرى وتميل بوضوح إلى الالتقاء فى مفهوم واحد وفكرة واحدة عن جزئ الفيروس وميكانيكية تناسخه هذا المفهوم يشمل الفرضيات الآتية:-

١ - تنسخ الفيروسيدات عن RNA تكميلى complementary وليس عن قوالب DNA.

٢ - هذه القوالب (RNA تكميلى) بالإضافة إلى الفيروسيدات الناشئة (الذرية المتكونة) كلها بنى بواسطة أنزيم العائل الموجود مسبقاً والأكثر احتمالاً هو أنزيم RNA polymerase II ويقوم بعمله مثل أنزيم Replicase أو كأنزيم RNA polymerase للحمض النووى RNA الموجه.

٣ - ينسخ الحمض النووى RNA المكمل للفيروس من جزئ فيروس دائرى بواسطة ميكانيكية اللف الدائرى والتي تؤدى إلى تكوين قوالب Multimeric وكميات كبيرة من معقدات تناسخ شبه وسيطة.

بعد هذه المقدمة الطويلة نستطيع أن نقول أن نتائج دراسات التهجين من عدة معامل قد أثبتت أن نباتات العائل سواء كانت سليمة أو مصابة لا تحتوى كميات يمكن التعرف عليها من DNA خاص بالفيروس. عندما إختبر RNA الموجود فى الخلية للتتابع الخاص بالفيروس فإن RNA المكمل للفيروس وجد للفيروسات PSTVd، CEVd وفى ASBVd. إن الأنسجة المصابة بالفيروس PSTVd تحتوى RNA تكملى للفيروس الكامل. ولقد ثبت نهائياً أن RNA فقط هو الوسيط الداخلى فى تناسخ الفيروس، ولزيادة الوصف للحمض RNA الخاص بالفيروس فإن التهجين بالمنقبات الخاصة بتتابع الشريط (-) أو الشريط (+) قد إستعمل. إن المنقبات الخاصة بالأشرطة السالبة كانت فيروسات معلمة باليود المشع ١٢٥، أما الشريط الموجب دى او كسى نيوكليوتايدز، 93 M13 mp ملونة تحتوى بتتابع الشريط الموجب. لقد إختبر بتتابع الشريط الموجب بشرط دى او كسى نيوكليوتايد سالب cDNA، معلم بفسفور مشع ٣٢ أو كلونات 99 M13 mp تحتوى بتتابع شريط سالب.

إن التحليل بطريقة Northern Blotting للشريط السالب ذو التتابع الفيروى أظهر أن الشرائط السالبة من نوع كثير الوحدات (multimers) باثنتين إلى خمسة أضعاف طول وحدة الفيروس، ولقد أمكن التعرف على تتابع أطول من طول وحدة الطول فى فيروس CEVd، ASBVd. إن الشرائط السالبة لوحدة الطول لا يمكن التعرف عليها بسهولة، وعلى أية حال متى وجد زوج واحد من الشرائط التكميلية فى كميات كبيرة أكثر من الأخرى فإن الشريط الأقل من الصعب أو لا يمكن أن يتعرف عليه بطريقة Northern hybridization.

لقد أمكن التعرف على الشرائط الموجبة قليلة ازواج الوحدات Oligomeric للفيروسات. فى النسيج المصاب بالفيروس PSTVd هناك مستوى قليل من ال dimers و trimers وفى النسيج المصاب بالفيروس ASBVd قد أمكن التعرف على مستويات عالية من ال Oligomers إلى حد eightmers. أما فى

الفيرويد ASBVd فقد وصفت أجزاء دائرية ثنائية مشابهة لتلك الموجودة في RNA2 في الكادانج - كادانج.

إنشطار بواحد الفيرويد قليلة الأزواج والتحليق في الفيرويدات

Splitting of Oligomer Viroid Precursors and Circularization of Viroids

إن التركيب الدائري للفيرويدات يمنحها فائدة القدرة الهائلة على الانتقاء أو الاختيار، نظراً لأن أنزيم ال polymerase حائلاً يترافق مع RNA يكون عنده القدرة لإنتاج نسخاً عديدة الأزواج طويلة والتي عندئذ يمكن أن تنشطر إلى نسخ وحيدة (هذا يعنى إلى جزيئات تكون ذات طول يساوى طول وحدة واحدة). إن الوحدات المستقيمة، على الأقل الشرائط الموجبة يجب أن تتحلق لتشكيل فيرويدات ناضجة.

ليس من الواضح تماماً بأى كفاءة تنشطر الوحدات العديدة إلى وحدة طول واحدة من الأحماض RNAs. إن الوحدات العديدة من الممكن أن تحتوى على تركيبات ثانوية مسبقة من وحدات monomers، وبالتالي فإن أنزيم Ribonuclease يمكن أن يحرر هذه الوحدات. أما في مجال الدراسات التي أجريت على تحكيم الفيرويدات، فإن هناك نوعان من الجزيئات المستقيمة قد عرفت في تحضيرات الفيرويد PSTVd الدائري والتي تختلف بوجود فتحة بين C181 و C182 وبين C348 و A349 بالترتيب. على الأقل فإن واحداً من هذه المستقيمات الطبيعية كان يعتقد أنها نتجت من إنشطار بادئ ال multimers. ولأسباب ثيرموديناميكية يجب على الباحث أن يتوقع تركيب لـ multimers يشبه تسلسل التركيبات الثانوية للفيرويد المتطاوول. في هذا التسلسل فإن الفتحة موجودة بين C181 و C182 يمكن أن تكون الواصلة بين التركيبات المتطاولة. إن تجاوز كل من A - C قد عرف أيضاً في RNAs كنقط ضعيفة بشكل خاص، وذكر أيضاً في بادئ RNA من البكتروفاج T₄ إنشطار ذاتي على هذه المنطقة. بجانب أنزيم Ribonuclease فإن

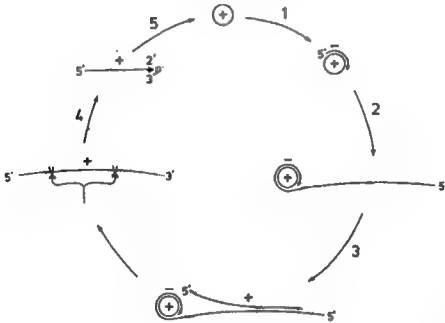
الهضم والتقطيع (الانقطاع) الذاتي يتم حتى إتحاد القطع الذاتية وتوصيلها (هذا يعنى وصل ذاتي للقطعة ليشكل وحدات دائرية مباشرة كما هو واضح في- Pre rRNA Tetrahymena). ومن ناحية أخرى فإذا كان الانقطاع والوصل هي تفاعلات منفصلة فيجب أن يتعرف على أنزيم في النبات والذي يربط- 2', 3'- cyclophos phosphate - terminated to 5 - phosphorylated RNA ليشكل روابط- 2' - phosphodiester - 3', 5'- phomonoester. هذا الأنزيم قد تبين أنه يحلق بكفاءة ما يسمى جزيئات الفيرويد المستقيمة في وضعها الطبيعي بالإضافة إلى جزيئات الفيرويد التي حدث لها استقامه صناعياً.

أشكال التناسخ : Models of Teplication

إن أشكال تناسخ الفيرويد استنتجت بشكل أساسي من نتائج التجارب والتي عرف فيها التتابعات الخاصة بالفيرويد لأطوال مختلفة وقطبية مختلفة. مع أنه لم يثبت بشكل كامل إلا أنه من المفروض أن الخيوط ال Oligomeric الموجبة والسالبة تعتبر وسيطات في التناسخ إذا قورنت بالمنتجات النهائية وهي تعتبر ملازمة لتقدم المرض. ولقد ذكر Branch & Robertson سنة ١٩٨٤ وصفاً طويلاً لتناسخ الفيرويد.

على أساس الدليل بأن الخيوط السالبة هي ال multimeric للفيرويد PSTVd وعلى أساس تخليق الفيرويدات الناضجة فقد افترض ميكانيكية الالتفاف الدائري في تخليق الفيرويدات وتتم كالآتي: - يبدأ بناء الشريط السالب من الشريط الدائري الموجب المعدى (خطوة رقم ١ في شكل ٤). تؤدي ميكانيكية الالتفاف الدائري إلى شريط سالب multimeric (خطوة رقم ٢). عندئذ تسلك الشرائط السالبة multimeric كقالب لانتاج أشرطة موجبة multimeric (خطوة رقم ٣) هذه الشرائط يجب أن تقطع لتمطي جزيئات مكونة وحدة طول واحدة بصفات نهاية المجموعات (خطوة ٤) ثم تتحلق (خطوة ٥) لتنتج ذرية من الدوائر. إن هذا الشكل الافتراضي يطبق على وجه الحصر على أنواع الحمض النووي لخاص بالفيرويد

والذى يمكن بسهولة التعرف عليه فى النباتات المصابة بالفيرويد PSTVd. زيادة على ذلك وكما ذكر سابقاً فإن النشاطات الأنزيمية المفترضة قد وجدت أيضاً فى خلايا النبات، مع أن أى منها لم يبرهن عليه بشكل محدد بأنه يدخل كجزء فى تناسخ الفيرويد فى الطبيعة كما اقترح فى شكل ٤.



شكل رقم ٤ :

رسم إفتراضى لتناسخ فيرويد PSTVd. الشكل مأخوذ من Robertson و Branch سنة ١٩٨٤.

لقد تبين من دراسات Bruening et al سنة ١٩٨٢ أن هناك مستويات عالية من الشرائط الموجبة multimeric من ASBVd ومستويات منخفضة جداً من التتابع السالب، وهذا أدى إلى الاستنتاج بوجود ميكانيكية لف دائرى مختلفة. إن الفيرويد ASBVd المخرق للنبات والذى هو monomeric يمكن أن ينقلب بواسطة أنزيمات العائل إلى جزئى دائرى سالب والذى عندئذ يعمل كقالب لبناء الدائرة الملتفة من تتابع ASBVd موجب مستمر والذى يعامل ليعطى ASBVd monomeric مستقيم كامل الطول بعد ربط ASBVd الدائرى ال monomer السائد.

هناك ميكانيكية ثالثة تشمل التفاف دائرتين. تبنى الشرائط السالبية Multimeric كما فى شكل (٤) ولكنها تعامل لتعطى دائرة monomeric من شريط سالب والذى يعمل كغالب لالتفاف دائرة ثانية ليتنج شريط موجب multimers. يؤدى القطع والتوصيل إلى إنتاج ذرارى من الفيرويد.

تناسخ الدائرة الملتفة Rolling circle Replication :

هناك إتفاق عام على أن RNAs فى الفيرويدات تناسخ بواسطة ميكانيكية الدائرة الملتفة. هناك طريقتين أمكن تعريفهما فى هذا المجال كما فى شكل ٤ ب. فى الجزء الأول من شكل (٤ب) فإن الدائرة الغازية ذات الخيط الموجب تنسخ بأنزيم RNA polymerase المعتمد على RNA ويسمى RNA dependent RNA polymerase ويتكون خيط سالب مرتبط مع بعضه (ملتف) خطوة ١. يحدث فى مناطق معينة إنشطار لهذا الخيط خطوة ٢ تعطى مونومير monomer والذى عندئذ يتحلل بواسطة أنزيم اللحام فى العائل RNA ligase خطوة ٣. يتكون RNA دائرى سالب هذا ينسخ بواسطة أنزيم RNA polymerase خطوة ٤. RNA الموجب المستقيم الطويل ينشطر فى أماكن مخصصة ويكون Monomers خطوة ٥، هذه تتحلل لتعطى الذرية الجديدة RNA دائرى والذى يكون عادة الشكل السائد فى الطبيعة. إن فيرويد واحد هو ASBVd وفيروسايد واحد هو vLTSV ومرافق واحد TRSV و HDV RNA أكثر احتمالاً لأن تتبع هذا الطريق فى تناسخها.

أما الميكانيكية الثانية فهى فى شكل ٤ب القسم الأيمن. وهى تشبه شكل القسم الأيسر باستثناء أن الخيط السالب الملتف فى الخطوة الأولى لا يحدث فيه إنشطار ولكنه ينسخ مباشرة ليعطى خيط مستقيم موجب (خطوة ٣) والذى ينشطر ليعطى Monomers ثم تتحلل الذرية الناتجة. إن مجموعة PSTVd من الفيرويدات والثلاثة أنواع الأخرى من الفيروسايدات تتكاثر كما فى هذه الطريقة.

إن الدليل على هذه الطرق المذكورة يستند على وجود RNAs السالب الموجب المتحلل فى الأنسجة المصابة ومعلومات مفصلة أخرى مثل وجود RNA ligase فى

النباتات الذى يمكن أن يُحلّق RNAs الفيرويدي المستقيم فى المعمل. كما وان RNA polymerase (s) فى نسخ RNAs السالبة والموجبة لم يمكن تحديدها مع RNAs polymerases الأول والثاني والثالث (I, II, III) كلها قد استخدمت فى تجارب مختلفة.

الإنشطار المتخصص لـ RNA أثناء تناسخ الدائرة الملتفة

Specific Cleavage of RNA during Rolling Circle Replication

تفاعلات الانشطار فى شكل ٤ يجب أن تكون فى مواقع متخصصة لانتاج Monomeric ونظراً لأن جميع البراهين توضح فى الفيرويدات، الفيروسايدات وجميع مراققات RNAs الصغيرة لا يمكن أن تشفر لأى بروتينات من الحجم المطلوب لأنزيم Ribonuclease وبالتالي فإن مثل هذا الانشطار يجب أن يتم بواسطة أنزيمات العائل أو بواسطة بعض الميكانيكات غير الأنزيمية كلاهما ذو تخصص عال فى التتابع. من الواضح أنه يجب أن يكون هناك نقطة إنشطار واحدة لكل وحدة Monomeric.

إن الفيروسايدات vVTMov, vSCMoV, vSNMN, vLTSV بالإضافة إلى الفيرويد ASBVd كلها تخضع لتفاعل الانشطار الذاتى فى المعمل فى الغياب الكامل للبروتين. يكون التفاعل عبارة عن إنشطار غير مائى بسيط حيث أن الرابطة داخل النيوكليتيده تخضع لتفاعل نقل فسفرة فى وجود Mg^{2+} تهاجم بواسطة 2'- hydroxyl على الفسفور تقود إلى 2', 3'- cyclic phosphate على النهاية 3' لواحد من أجزاء RNA المنشطرة، و 5'- hydroxyl على النهاية الأخرى. يكون التفاعل أبسط ومختلف تماماً عن العملية غير الأنزيمية للاترونات من بوادئ الرايوسومال فى Protozoan Tetrahymena حيث Guanosine عامل مساعد يكون مطلوباً والنهايات المنشطرة تحتوى 5'- phosphate و 3'- hydroxyl.

يكون تفاعل الانشطار الذاتى هذا بشكل واضح هو الأساس للانشطار المتخصص المطلوب فى الطبيعة خلال تناسخ الدائرة الملتفة.

العقبة الكبرى التي تعترض هنا هي الميكانيكية التي بواسطتها جميع الفيريدات التابعة لمجموعة PSTVd تكون قد نشأت من أطول من وحدة طول نواحي تناسخ الدائرة الملتفة. لا يبدو أنها محمية النيوكليوتيدات المحفوظة المطلوبة لتفاعلات الانشطار الذاتي الموصوفة لغاية الآن. هناك محاولات أجريت للحصول على إنشطار ذاتي هام تخصصي في المعمل إلا أنها كانت غير ناجحة، إلا أن بعض الباحثين استطاع الحصول على انشطار تخصصي معقول لبودئ من PSTVd وإنتاج monomers دائرية عندما استعمل بودئ أطول من وحدة طول وحضنها مع مستخلصات أنوية النبات. أخذت هذه النتائج لتدل على أن عمليات الانشاء في الطبيعة لبودئ من PSTVd تتطلب عمل أنزيمات RNase التخصصية في النبات.

بالرغم من هذا الدليل المفصل، إلا أن الميكانيكية الأكثر احتمالاً في الطبيعة سوف تكون نوعاً من تفاعل الانشطار الذاتي. هناك ثلاثة أنواع من تفاعل الإنشطار الذاتي قد تم تحديدها فعلاً في ١٢ إنشطار ذاتي فقط لـ RNAs التي تم وصفها لغاية ١٩٩١. تسعة خلال تركيب رأس المطرقة وتركيب غير معروف في RNA السالب من STRSV وتركيب آخر غير معروف لـ RNAs الموجب والسالب في HDV. يبدو من المعقول جداً أن هناك نوعاً آخر من تفاعل الانشطار الذاتي يمكن أن يحسب لمعاملة (بناء) البودئ في جميع أفراد مجموعة PSTVd.

تظهر نتيجة الأبحاث المنشورة أن كلونات cDNA المونوميرك PSTVd أو CEVd معتمدة على وجود التتابع في النهاية 5' للفيريود المقحم والتي تتكرر بعد النهاية 3' في هذه القطعة المنفردة. دراسات أخرى على الطفرات اقترحت بأن مواقع البناء في بودئ ال CEVd تحدث في واحد من ثلاثة مواقع في الجهة العلوية من النطاق C.

تفاعل الإنشطار الذاتي لرأس المطرقة في ASBVd

Hammerhead self - cleavage Reaction in ASBVd

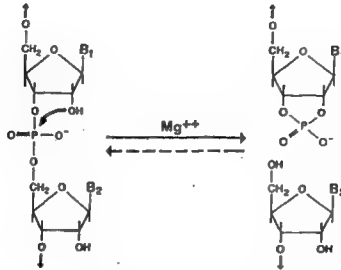
لقد درس هذا الموضوع من قبل كثير من الباحثين منذ سنة ١٩٨٩ وحتى سنة ١٩٩١ وفيما يلي نذكر ملخصاً لهذا الموضوع:-

تخضر نسخاً من RNA سالب وموجب من كلونات cDNA من ASBVd و vLTSV ذات إنشطار ذاتي بصفة تخصصية عالية أثناء النسخ وبعد العزل في الغياب الكامل للبروتين. يشمل التفاعل Mg^{2+} عامل مساعد لتفاعل نقل الفسفرة الذي يشطر ال RNA ليعطي نهايات ذات $5'$ -hy- و $2'$, $3'$ - cyclic phosphate droxyl شكل (٥). على أساس مواقع متخصصة في الانشطار يتكشف تركيب رأس المطرقة ثنائي الأبعاد محفوظ (شكل ٦) هذا يمكن أن يضاف إلى RNAs ذاتي الانشطار من ASBVd سالب وموجب.

إن تركيب رأس المطرقة لشكل ٦ يتركب من ثلاثة سيقان زوجية القاعدة (III, II, I) حول منطقة احادية الخيط مفتوحة ذات ١٣ نيوكليتيده (شكل صندوق) والتي تكون محفوظة في تسعة RNAs ذات إنشطار ذاتي معروفة (لغاية ١٩٩١) والتي تنشطر خلال هذا التركيب. مع أن الدليل الواضح لم يحصل عليه، إلا أنه يبدو من المحتمل أن تفاعل الانشطار الذاتي الموصوف في المعمل يكون أيضاً مسؤولاً عن بناء بوادي من ال Oligomeric في الطبيعة.

تركيب رأس المطرقة ثنائي الأبعاد كما في شكل ٦ لا يستطيع أن يشرح بوضوح لماذا يكون هناك إنشطار غير أنزيمي لـ RNA على مواقع معينة. من المعتبر أنه في وجود Mg^{2+} ، فإن تركيب رأس المطرقة يتخذ تركيب ثلاثي نشيط والذي يخفض كفاءة الطاقة التنشيطية ويخصص بعمله على رابطة النيوكليتيده الداخلية من مواقع الانشطار الذاتي ليسمح بنقل الفسفرة في تفاعل الانشطار الذاتي. عند الإنشطار فإن التركيب يتراخي وبالتالي يمنع التفاعل العكسي من الحدوث مع العلم أنه من ناحية نظرية جميع التفاعل يكون منعكس.

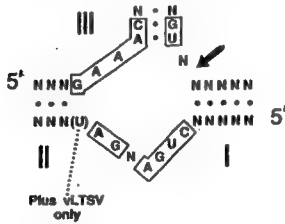
أما في حالة ASBVd فإن التتابعات الداخلية في تفاعل رأس المطرقة تزودنا بمعلومات عن الخطوة التي تعتبر مفتاحاً في دورة التناسخ، وهو أيضاً التتابع الوحيد في هذه الممرضات RNAs. وبالتالي ففي حالة ASBVd فإن مواقع الانشطار الذاتي الموجب والسالب تكون ١٤ نيوكليتيده منفصلة وأن التتابع في تركيبات رأس المطرقة تشمل تقريباً الثلث المركزي لجميع الجزئ.



شكل رقم ٥ :

تفاعل الانشطار الذاتي الذي يشمل تفاعل نقل الفسفرة من

5'- hydroxyl of the 3' nucleotide residue to the 2'- hydroxyl of the 5' residue.



شكل رقم ٦ :

تركيب رأس المطرقة حول منطقة الانشطار الذاتي لفيرويد ضربة الشمس في الاقروكادو والأريمة
فيروسايدات ومراققات. هناك ١٣ نيوكليوتيدة محفوظة في قلبه والنيوكليوتيدات غير المحفوظة
يشار إليها N.

غياب منتجات الترجمة : Absence of Translation Products

تعتبر الفيرويدات هي الكائنات الوحيدة ذات نظام التناسخ الذاتي والذي لا يعمل شفرة لتناسخه ولا وحدات صغيرة subunit لأنزيم التناسخ الخاص به. مع أنه لا يوجد برهان تجريبي نهائي يدل على أن المعلومات الوراثية للفيرويدات لا تعبر عن نفسها في بروتين صغير، هناك عدة نقاط ذات توضيح سلبى فى مناقشة ذلك.

إن كفاءة الفيرويدات على التشفير يمكن أن تؤدي إلى بروتين ليس أكثر من ١٢٠ حمض أميني، فمثلاً بالنسبة للفيرويد PSTVd فإن أطول بروتين، يمكن أن ينتج من أكثر من دورتين من الترجمة، شريطة أنه في هذه الحالة أن مثبطات كودون UGA يجب أن تكبح. إن الافتقار إلى مواقع ربط الرايوسومات وغياب التركيب القلنسوى، التابع المجاور مباشرة، ثبات التركيب الثانوى والدائرية كلها لا تناسب نشاط mRNA. أما في المعمل فإن أنظمة الترجمة لا يمكن التعرف على منتجات خاصة بها إذا كان الفيرويد PSTVd أو CEVd يمكن أن يظهر عمل مثل mRNA. إن المقارنة الدقيقة لنماذج بروتين من نبات *Gynura aurantiaca* المصابة بالفيرويد CEVd ونباتات الطماطم المصابة بالفيرويد PSTVd مع نباتات كتنترول متماثلة من نباتات سليمة أظهر بأنه لا يوجد شفرة فيرويدة مختلفة. وباختصار يمكن القول بأن تناسخ الفيرويد يعتمد على أنزيمات polymerase العائل ولا يشفر لنفسه.

دراسة العرض الفيريويدي

١ - المصادر : The Sources

تمتلك بعض الفيرويدات مدى عائلى واسع بشكل واضح، وهذا يعنى أن RNA الفيريويدي يمكن تحضيره ليس فقط من العائل الذى فيه اكتشف الفيرويد أصلاً، ولكن أيضاً من النباتات الأخرى والتي يمكن أن تكون أكثر ملائمة لتحضير الفيرويد. فى كثير من الحالات فإن نقل الفيرويدات إلى عوائل نباتية أخرى لا يؤدي إلى ظهور أعراض معبرة عن الإصابة وبالتالي يجب أن

يستعمل طرق تشخيصية أخرى. ذكرت أنواع كثيرة من النباتات بأنها قابلة للإصابة بفيروس PSTVd معظمها يتبع العائلة الباذنجانية. كذلك فقد تبين أن فيروس تفرم قمة الطماطم TASVd يكون مشابهاً لفيروس PSTVd في المدى العائلي. أما فيروس اكسوكورتر الحمضيات CEVd فإنه يتضاعف ليس فقط في نباتات الحمضيات ولكن أيضاً في نباتات العائلة المركبة مثل نبات *Gynura aurantifolia* وفي نباتات العائلة الباذنجانية. أما فيروس الاقحوان (التفرم والشحوب المتبرقش) تنتقل فقط إلى أنواع أخرى من العائلة المركبة. أما فيروس الثمرة الباهتة في الخيار يبدو أنه منحصراً أساساً في العائلة القرعية وذكر أنه ينتقل إلى الطماطم. وكذلك فإن فيروس تفرم حشيشة الدينار يصيب العائلة الباذنجانية، القرعية، التوتية. لقد وجد أن فيروس ضربة الشمس في الأفوكادو يصيب فقط الأفوكادو والقرع وكلاهما يتبع العائلة الشفوية. إن المدى العائلي لفيروس كاداغ - كاداغ في جوز الهند يختلف عن بقية الفيروسات في أنه يصيب نخيل جوز الهند فقط وهو الفيروس الوحيد الذي يصيب نباتات أحادية الفلقة.

إن نقل الإصابة الفيروسية إلى نباتات العائل تحت الاختبار يكون مهماً للدراسات الكيموحيوية وذلك لأن العوامل الاصطناعية في بعض الحالات تنمو بسرعة أكثر تحت ظروف جوية متحكم بها، وتكون أنسجتها أكثر سهولة في التعامل لتحضير عزلات من الفيروس. لقد ثبت بالبرهان العملي أن نباتات الطماطم أكثر ملائمة لتجارب المدى العائلي. ولقد تبين أن PSTVd و CEVd تخضع لتغيرات بسيطة فقط بعد نقلها من نباتات الطماطم إلى نباتات *Gynura*.

وكقاعدة عامة فإن التعبير بالأعراض يحدث في نباتات الطماطم بعد ١٠ - ١٤ يوم من الحقن عندما تنمو النباتات تحت كثافة ضوئية عالية ودرجة حرارة مرتفعة ٣٠ - ٣٥ م خلال النهار وحوالي ٢٠ م خلال الليل. هذه المدة يمكن أن تطول إلى ٢ - ٣ شهور إذا نمت النباتات تحت درجة حرارة ٢٠ م. ولقد تبين أن تناسخ الفيروس وتعبيره بالأعراض يأخذ مجرى تقريباً في نفس الوقت وأن أفضل إنتاج من RNA الفيروسي يحصل عليه بعد ٣ - ٦ أسابيع من الحقن.

نظراً لأن الفيرويدات تصيب النبات جهازياً فمن الممكن أن تخضر بشكل رئيسي من أى جزء فى النبات. إذا نمت نباتات طماطم مصابة تحت ظروف مثلى فى الصوبا الزجاجية، فإن طريقة التنقية تضم كبريتات السزيوم Cs_2SO_4 ، آلة الطرد عن المركز عالية السرعة - سائل كروماتوغرافى عال الكفاءة HPLC. استعمال هذه المواد يؤدي إلى الحصول على كمية من PSTVd كالأتى :-

كمية الفيرويد	وزن الجزء النباتي
٥٠٠ ميكوغرام	$\frac{1}{4}$ كيلو غرام أوراق
٣٠٠ ميكوغرام	$\frac{1}{4}$ كيلو غرام سيقان
١٨٠ ميكوغرام	$\frac{1}{4}$ كيلو غرام جذور

تتم معظم طرق التحضير اساساً من الأوراق، ولكن السيقان يمكن أن تستعمل أيضاً، إذا كان من الممكن عمل مسحوق متجانس منها كما فى حالة نباتات الطماطم.

تستطيع الفيرويدات أن تنمو باستمرار فى المعلقات الخلوية، فى البروتوبلاست وفى مزارع الكالوس كما كان واضحاً فى التجارب على مزارع من الطماطم والبطاطس.

٢ - التشخيص Diagnosis :

يكون هناك نوعاً من الالتباس عند تمييز الاصابة الفيريودية اعتماداً على الأعراض فقط، حتى بعد نقل الإصابات الفيريودية إلى العوائل المشخصة والنظر إليها نظرة خبير متمرس فى أمراض النبات، فإن التشخيص بواسطة التعرف على الأعراض يكون غير موثوق ولا ملائم بشكل عام. كذلك فإن الفيرويدات لا يمكن تعريفها بالطرق السيولوجية وذلك بسبب عدم المقدرة على الحصول على أجسام مضادة ضد RNA الفيريوى بالرغم من المحاولات العديدة التى أجريت بهذا الشأن.

إن التشخيص السليم يتم الحصول عليه بواسطة التعرف على الحزم الفيريديية فى الهجرة الكهربائية فى الجيل Gel electrophoretic أو بواسطة التهجين الجزيئى. إن طرق الهجرة الكهربائية فى الجيل Gel electrophoretic تتضمن الحصول على محلول متجانس من غرام أو بضعة غرامات من النسيج النباتى، مستخلص حمض نووى. فى بعض الحالات تستبعد الأحماض النووية ذات الوزن الجزيئى العال وذلك بواسطة الترسيب فى كلوريد الليثيوم، ثم الترسيب بالايثانول للأحماض النووية الباقية. يحلل المستخلص الخام من الحمض النووى الناتج على مادة polyacrylamide slab gels. أيضاً يستعمل 7.5% polyacrylamide gels بالنسبة للفيريدات ذات الوزن الجزيئى لغاية 12000 دالتون (PSTVd) أو 2.5 - 3% للفيريدات الكبيرة مثل كاداج - كاداج. عند إضافة 8 مول يوريا يحصل على حزم ضيقة. هناك زيادة يمكن ادراكها فى الحساسية وخفض فى الزمن مطلوبة للتشخيص بالهجرة الكهربائية حصل عليها عندما كان السير فى ظروف طبيعية مشتركاً مع سير متعاقب تحت ظروف دنترة فى الهجرة الكهربائية ذات الاتجاهين. هذه الطريقة ادت إلى فصل نقى لجزيئات الفيريود الدائرية عن جميع الأحماض النووية الخلوية. يمكن أن تستعمل مع مستخلصات خام غير مجزأة كلية. علاوة على ذلك فإن طريقة الصبغ بالفضة أدت إلى الحصول على كمية قليلة تقدر 60 نانوغرام من ال RNA الفيريودى لكل غرام من نسيج ورقة الطماطم وأعطت 60 بيكوغرام فى حزمة مفردة، وفى أبحاث أخرى أعطت 2 نانوغرام فيريود لكل غرام من نسيج الطماطم و 80 بيكوغرام فى حزمة مفردة. إن استعمال الهجرة ذات الاتجاهين فى العزل الكهربائى سهلت العمل فى تطبيقات روتينية لكثير من عينات الأنسجة فى وقت واحد.

إن إختبارات التشخيص للفيريدات المبنية على تهجين DNA تكملى ذو قوة إشعاعية عالية قد استعملت مع كثير من الفيريدات وكانت الإختبارات تجرى بواسطة Dot - spot hybridization مع cDNA مكلون للفيريود

cDNA أو عن طريق Liquid hybridization مع منقيات cDNA. وذلك بالنسبة لكل من RNA في فيروس كاداغ - كاداغ وفيروس ASBVd. أما هذا الفيروس الأخير ASBVd فقد أمكن تعريفه بالتهجين الذاتي - self hybridization مع RNA للفيروس نفسه المعلم بالفسفور المشع 32 . إن حساسية اختبارات التهجين قد ذكرت بأنها تصل ما بين ٢٠ - ٨٠ نانوغرام فيروس لكل غرام من النسيج المصاب. ويتقدم طرق التهجين وباستعمال منقيات معلمة M13 يمكن زيادة حساسية الاختبار إلى الضعف. يعتبر اختبار الهجرة الكهربائية بالجيل أسرع حيث يحتاج إلى يوم واحد بالمقارنة مع أربعة أيام بالنسبة لطرق التهجين، إلا أن طرق التهجين تحتاج إلى عينات أكثر. تكون طريقة الهجرة الكهربائية في الجيل حساسة لتركيب فيروس معينة (الدائري) كما أنها لا تستطيع التفريق بين تنابعات مختلفة، بينما طريقة التهجين تعرف فقط تعاقبات معينة بغض النظر عن التركيب، وبالتالي فإن كلتا الطريقتين تكمل كل منها الأخرى في صفاتها.

٣ - كلونة الجزيء Molecular Cloning :

في الوقت الحالي فإن تنابعات الفيروس المكلون وجدت لها مجالاً كبيراً في التطبيق في أبحاث الفيروس مثل :-

أ :- التنابع Sequencing .

ب: التهجين لتشخيص الفيروس، الدراسات التي تجرى لمعرفة المركبات الوسيطة في تناسخ الفيروس وانتشار الفيروس في الخلية.

ج :- حيوية cDNA المكلون والمواقع الموجهة للمطفرات .

إن جدول رقم ٤ يلخص الطور الكامل، والكولونات ذات الحجم الصغير مذكورة مع البلازميد، موقع وإتجاه الإدخال والخفيزات. بالإضافة إلى الكلونة الجزيئية لكل من TASVd، TPMVd، CPFVd.

جدول 4 : كلونات cDNA لبعض الفيرويدات.

الفيرويد	البلازمو	المحفز	موقع الإدخال	الحجم والاتجاه
PSTVd	pGI 101 H	lac	Hae III 146	monomerid (+) and (-)
PSTVd	pBR 322	tet	Bam H 1 87	monomeric (+) and (-) dimeric (+) and (-)
PSTVd	pBR 322	—	Bam H 1 87	monomeric +
HSVd	pGL 101	lac UV5	Eco R 1 296	monomeric (+) and (-) dimeric (+) and (-) tetrameric (+) and (-)
CEVd	pBR 322	—	Bam H 1 87	monomeric (+)
ASBVd	pBR 322	—	—	—

4 - التنقية Purification :

تكمّن تنقية الفيرويد في خطوتين أساسيتين هما: -

١ - تحضير مستخلص من RNA ذو وزن جزيئي منخفض.

٢ - التنقية النهائية للحمض الفيرويدي RNA من هذا المستخلص.

في معظم الاجراءات فإن الحمض النووي الكلي يستخلص من مزيج النسيج المتجانس بواسطة نظام Buffer / phenol المحتوى على هيدل الصوابين SDS وعلى benfonite مطبق أنزيم RNase. تفصل عديدات السكر وال DNA من ال RNA بواسطة استعمال نظامى الاستخلاص والترسيب بمادة Cetyl trimethyl ammonium bromide. عندئذ يستبعد RNA ذو الوزن الجزيئي العال عن طريق الترسيب باستعمال ٢ مول من كلوريد الليثيوم. بعد ذلك يمكن الحصول على

المحتويات الخصبة من الفيرويد فى مستخلص RNA ذو الوزن الجزيئى المنخفض بعدة خطوات من العملية التى تسمى كروماتوغرامى. هناك طرق حديثة مشابهة لما سبق تستعمل فى تحضير مستخلص خام من فيروسات HSVd، TMSVd، TPMVd.

فى بعض الطرق المختلفة فإن مستخلص RNA ذو الوزن الجزيئى المنخفض كان يحصل عليه بعد استعمال كبريتات السيزيوم الكثيفة فى آلة الطرد عن المركز، هذا يعنى أن عديدات التسكر، ال DNA، RNA، ذوات الوزن الجزيئى العال ومكونات أخرى فى النسيج يمكن استبعادها بخطوة واحدة. إن استعمال طريقتى الترسيب باستعمال ٢ مول من كلوريد الليثيوم والترسيب المتعاقب للمواد الطافية باستعمال ٠,٥ حجم من الايثانول يعطى مستخلص RNA خال من أى من ال DNA وال RNA ذوات الوزن الجزيئى المرتفع مع بقاء قليل من tRNA. إن ترسيب RNA من محلول عال الملوحة باستعمال تركيز منخفض من الايثانول يمكن أيضاً إستعماله للاستعادة السريعة للحمض RNA ذو الوزن الجزيئى المنخفض من كبريتات السيزيوم المنحدرة إذا ما ضبطت الأجزاء المتماثلة على كثافة نهائية ١,١٨ غم / سم^٣.

أما الخطوة الثانية فإن الفيرويدات تنقى من مستخلص RNA الخام إلى الحالة المتجانسة ثم تستعمل طريقة Polyacrylamide gel electrophoresis. ويفضل استعمال هذه الطريقة ذات الاتجاهين (سنذكر ذلك بالتفصيل إن شاء الله فى الفصل الثالث). أو يمكن استعمال هذه الطريقة باستعمال الجريان مرتين، المرة الأولى تحت الوضع الطبيعى أما الثانية فتكون تحت ظروف الدنترة. إن المأخذ على هذه الطريقة Preparative gel electrophoresis هو الكمية القليلة المتحصل عليها من الفيرويد وطول الوقت، يمكن التقليل من هذه العيوب باستعمال عامل التبادل الأيونى وهو الراتنج للاستعمال فى سائل الكروماتوغرافى ذو الكفاءة العالية. لقد أمكن الحصول على ٢٠٠ ميكروغرام RNA للفيرويد PSTVd متجانس من مستخلص خام للحمض RNA (محضر بواسطة كبريتات السيزيوم فى آلة الطرد عن المركز) من جريان مرة واحدة فى الكروماتوغرافى. كانت نسبة الانتاج والتقية تزيد عن ٧٩٥.

ميكانيكية نشوء المرض (المرضية)

Mechanism of Pathogenesis

هناك تساؤلاً يطرح نفسه على الباحث وهو ما هي الميكانيكية التي بها تحدث الفيروسات أمراضاً في عوائل معينة، علاوة على ذلك فإنها تتضاعف (تتناسخ) في أنواع نباتية أخرى بدون إحداث أضراراً مميزة ٩٩.

للإجابة على هذا السؤال هناك ثلاثة تفسيرات قد تكون موضحة لهذا التساؤل، إلا فإن الأبحاث المستقبلية سوف توضح ذلك. هذه التفسيرات هي:-

١ - إن وجود الفيروس في نواة المائل وعلم مقدرته الظاهرة ليعمل عمل mRNA يؤدي إلى القول بأن أعراض المرض المتسببة عنه قد تكون ناتجة عن التداخل أو التفاعل المباشر للفيروس مع جينوم المائل، هذا يعني عن طريق تداخله في التنظيم الجيني في الخلايا المصابة.

٢ - إذا كان التفسير السابق حادثاً بالفعل، فإن الفيروسات يجب أن تعتبر بأنها جزيئات تقوم بإحداث خلل في التنظيم الطبيعي في الخلية أو تقوم بتنظيم غير طبيعي في الخلية. وإذا كانت الفيروسات نشأت فعلاً من إنترونات، فإن تأثيراتها الضارة على وظائف خلية المائل قد تكون نتيجة التداخل في عمليات نضج mRNA.

٣ - هناك إقتراحاً ثالثاً لنشوء المرضية بالفيروس، هذا الإقتراح يفترض بأن الفيروس يقوم بتجنيد RNA polymerase II للمحمض DNA التابع للنوى بواسطة جزيئات الفيروس المعدي وذلك لاستكمال أو إنجاز تناسخه (الانانية في التناسخ)، ويثبط أو يكبح بناء mRNA's جينومي في خلية المائل وبالتالي يعوق أو يفسد عمليات التمييز أو التخليق في الخلية.

يجب أن نؤكد على أن جميع هذه التفسيرات هي عبارة عن إقتراحات إلى حد بعيد ولكي يكون أى من هذه التفسيرات الثلاثة المذكورة سابقاً معقولاً يجب أن لا ينظر إلى نتيجة الإصابة الفيريودية الملاحظة وهي الأعراض، ولكن أيضاً يجب النظر إلى الحقيقة المذكورة سابقاً وهي أنه في بعض الأنواع النباتية فإن الفيرويدات تتناسخ بشكل كاف دون أحداث ضرر واضح مميز على العائل، وفيما يلي بعض المعلومات قد تلقى بعض الأضواء على هذا الموضوع.

١ - علاقة المرض مع البروتينات والمركبات الأخرى:

كما ذكر سابقاً فإنه لم يوجد فيرويد يعمل شفرة لبناء البروتين. وعلى أية حال فإنه في نسيج مصاب بالفيرويد CEVd من نبات *Gynura aurantiaca*، طماطم والبطاطس، فإن هناك نوعان من البروتينات ذات أوزان جزيئية تتراوح ما بين ١٢ - ١٨ ألف دالتون، تتراكم في النسيج. وفي نسيج نبات الطماطم المصاب بالفيرويد PSTVd وجد بروتين ذو وزن جزيئي ١٤ ألف دالتون، وهذا كان وجوده بتركيز أعلى في النباتات المصابة عنه في النباتات السليمة، إلا أن هذه البروتينات ليست متخصصة بالإصابات الفيريودية، ولكنها تظهر أيضاً بعد الإصابة الفيريودية وفي النباتات الطبيعية التي وصلت طور الشيخوخة. قد ينظر إلى هذه البروتينات على أنها إستجابة فسيومرضية Pathophysiological للنبات العائل. كذلك ذكر حدوث بعض التغيرات بعد حدوث الإصابة بالفيرويد، في التركيز الكلي للأحماض DNA ، RNA ، والبروتينات وفي المحتوى والتركيز للعناصر المعدنية وفي تركيز حمض الكلورجنيك. هذا يدعم التفسير الأول الذي ذكر سابقاً.

٢ - تماثل التتابع مع الأحماض النووية RNAs الصغيرة:

عند إجراء دراسات حول الفيرويدات والأحماض النووية الصغيرة RNAs (U1 - U6) في الكائنات الحية الدقيقة مميزة النواة، أمكن التعرف على بعض التماثل في تتابع النيوكليوتيدات هذا التتابع كان واضحاً بشكل جيد.

إن الأكثر وضوحاً في هذا المجال هو تماثل التتابع بين النهاية 5' في U1 RNA والمنطقة الأكثر حفظاً في الخيط السفلى في التركيب الثانوي (سيذكر ذلك بالتفصيل إن شاء الله في الفصل الثالث) في الفيروسات من مجموعة PSTVd. وبالاتتماد على الأبحاث اللاحقة فإن U1 RNA يتدخل في عملية التراكب splicing (سبق ذكرها) والتي فيها تقطع الانترونات من الحمض النووي RNA غير المتجانس ويتكون mRNA المطلوب. في هذه الأشكال فإن النهاية 5' من U1 RNA تشكل أزواج قواعد بنهائيتين من الانترون. ويعتقد أن الفيروس يمكن أن يحل محل U1 RNA ويتدخل في عملية التراكب، وأيضاً يعتقد أن خيط الفيروس السالب يتفاعل مع ويوقف عمل U1 RNA. إن تكوين دبابيس الشعر (في تركيب الفيروس) يمكن أن تكون ناتجة عن مثل هذا التفاعل أو أن دبابيس الشعر الثابتة يمكن أن تناسب هذا التفاعل. وفي أشكال مختلفة من PSTVd يمكن أن يحدث تفاعل بواسطة منطقتين غير متجاورتين مع مواقع التراكب في mRNA للمائل. هناك مناطق مشابهة ولكن غير متماثلة تماماً وتكون أيضاً موجودة في العزلات المعتدلة من الفيروسات PSTVd و CSVd. إن الأعراض غير الشديدة في الاقحوان والتي تظهر بعد الإصابة بثلاثة فيروسات تكون في حالة توازي مع التفاعل المتوقع للفيروسات مع مواقع التراكب على الأحماض mRNAs.

وعلى أية حال فإن تواجد الفيروسات الناضجة في النوية ووجود U1 RNA في أجزاء الرايبونوكليوبروتين تبطل الشكل المذكور سابقاً في نشوء المرض. فقط فإن الحمض النووي الصغير U3 RNA المعروف بأنه موجود في النوية. وكذلك وجد أن تتابع متماثل بين PSTVd و U3 snRNA من خلايا No-vik off hepatoma قد وجد فعلاً في النوية. لم يمكن التوصل إلى أشكال (من هذه المذكورة) تساهم في نشوء المرضية تشبه هذا التماثل.

٣ - إختلاف التتابع Sequence Variation :

إن تتابع النيوكليوتيدات فى سلالات الفيرويد ذات الاختلافات فى تعبيراتها بالأعراض المرضية قد حددت لكل من PSTVd، CEVd. أما فى هذا الأخير فإن الأعراض الناتجة عن عزلات مختلفة لا يمكن تقسيمها من المعتدلة إلى البقع الميتة ولا يمكن أن تفسر فى اصطلاحات محددة تماماً متضمنة مناطق الشدة على الفيرويد. يمكن أن تصنف الأعراض بسهولة من المعتدلة إلى أعراض البقع الميتة وإن الاختلافات فى التتابع يكون محدوداً على الجزء الكبير من التركيب الثانوى المتكون بواسطة النيوكليوتيدات ٤٠ - ٣٠٥، ٥٥ - ٣٢٠ وإلى مقدار بسيط حول النيوكليوتيدات ١١٥ - ١٢٥. إن العالم Sanger وتلاميذه قد إقتنعا بأن الاختلاف الكبير يؤثر فى الشدة وذلك عن طريق تغيير الثبات الثيرموديناميكى لتلك المنطقة، وأن الاختلاف القليل يعدل بحيث يحدث توازناً مع العدد الكلى من النيوكليوتيدات والتى هى ٣٥٩ لجميع السلالات. تقع المنطقة ذات الإختلاف البسيط المرن من ال Oligopurine. ولقد تبين أن هذه المنطقة هى واحدة من المناطق ذات الثبات الثيرموديناميكى المنخفض جداً والذي يمكن أن يخضع إلى عملية التفكك المسبقة. إن تقدير الثبات الحرارى لهذه المناطق المتفككة مسبقاً ينتج العلاقة التى تقلل الثبات، هذا يعنى كلما كان هناك زيادة فى إظهار التفكك المسبق يكون هناك زيادة فى الشدة يتبع ذلك.

٤ - cDNA المكون للفيرويد المعدى Infectious Viroid cDNA Clones :

لقد ذكر العالم Owens سنة ١٩٨١ أن DNA للبلازميد المحتوى cDNA dimers للفيرويد PSTVd كانت معدية. عندما ينسخ RNA من هذه البلازميدات وعندما يحتوى التتابع لـ PSTVd تكون أيضاً معدية. إن التتابع فى ذرية الفيرويد و DNA المكون كانت متماثلة. أما عن الحيوية فلم يمكن إظهارها بالبلازميدات المحتوية monomers للحمض cDNA للفيرويد PSTVd. لقد تمكن Ohno et al

سنة ١٩٨٣ فى المعمل من بناء جزيئات RNA معدية من cDNA مكون للفيرويد HSVd. لقد ذكر Meshi et al سنة ١٩٨٤ حتى الخيوط المزدوجة من cDNAs تحتوى من ١ - ٣ وحدات من تتابع الفيرويد HSVd بدون محفزات promoters كانت معدية. كانت حيوية تتابع الوحدة الواحدة منخفضة، لكنها وجدت فى cDNA الذى أخذ من قطع فى دائرة الفيرويد فى مواقع مختلفة. كما أن الباحثين قد توقعوا أن وحدة الطول الواحدة cDNA من يمكن أن تلتحم مع Dimers فى النباتات المصابة قبل أن يبنى RNA معدى.

لقد أكد جميع الباحثين الذين يعملون على cDNA المكون الفيريدي المعدى على أن تتابع الفيرويد يمكن أن يحدث فيه تغير بواسطة مطفرات تعمل مباشرة على المواقع المخصصة لذلك، وهذا يمكن أن يستعمل كأداة مؤكدة للدراسة ميكانيكية نشوء المرضية وتناسخ الفيرويد.

ونستطيع أن نختم هذا الموضوع بالفقرة التى ذكرها العالم Symons فى مقاله المنشور فى مجلة Virology عدد واحد صفحة ٨٠ لسنة ١٩٩٠ حيث قال:

بالرغم من معرفتنا الكبيرة عن تتابع الفيرويدات وتركيبها وتفهمنا الزائد لتناسخها، إلا أننا بشكل أساسى لا نمتلك الادراك الحقيقى لكيفية حدوث الأعراض من قبل الفيرويدات. ونظراً لأن الفيرويدات لا يبدو بأنها تشفر لأى بروتين أو عديد بيتايد، فمن المحتمل أنها تمارس تأثيرها خلال تتابعها والتركيب الثانوى والثلاثى Tertiary structure، حيث أن هذه الصفة وهذا التركيب تتداخل بشكل خاص مع واحد أو أكثر من مكونات الخلية. إن كفاءة الفيرويدات للتدخل مع بعض الأحماض النووية RNAs فى الخلية له أهمية ونتائج كبيرة.

ومن ناحية أخرى فإن أهمية تدخل الفيرويدات وطرق هذا التدخل مشروحة باسهاب كبير من قبل العالم Sanger فى بحثه سنة ١٩٨٨.

مقارنة بين الفيروسات وبعض الكائنات الأخرى

١ - مقارنة بين الفيروسات والبكتيريا :-

كما سبق وذكرنا فإن الفيروسات هي كائنات صغيرة ذات وزن جزيئي منخفض من الحمض النووي RNA والتي تستطيع أن تهاجم خلايا النبات وتكاثر أنفسها اعتماداً على نفسها وتسبب أمراضاً للنبات. تختلف الفيروسات عن البكتيريا في بعض الصفات هي :-

أ - حجم الحمض النووي RNA. إن حجم هذا الحمض في الفيروسات له وزن جزيئي صغير يتراوح ما بين (١١٠٠٠٠ - ١٣٠٠٠٠) دالتون. أما في البكتيريا فيكون وزنه الجزيئي من مليون إلى عشرة ملايين دالتون.

ب - الصفة الثانية وهي حقيقة أن الحمض النووي RNA الفيروسي أو ال DNA يكون مغلفاً بغطاء بروتيني، بينما الفيروسات لا يوجد عليها غطاء بروتيني، وتوجد بوضوح بدون غطاء بروتيني يعني أنها حمض نووي حر ليس عليه غطاء.

ج - تتابع النيوكليوتيدات ووجود النطاقات في الفيروسات تختلف عنه في البكتيريا.

د - الفيروسات تستطيع أن تشفر للبروتين أما الفيروسات فلا تستطيع.

هـ - تتناسخ الفيروسات ويزداد عددها بطرق مختلفة عن التي تتبعها البكتيريا.

و - تظهر أعراض الأمراض الفيروسية بعد فترة حضانة تقل كثيراً عن التي تحتاجها الأمراض الفيروسية حيث أن بعض الأمراض الفيروسية تحتاج إلى سنتين بعد الحقن لتظهر الأعراض على المائل.

ز - الفيروسات تهاجم النباتات الراقية والحيوانات والفطريات والبكتريا أما الفيريونات لم يعرف حتى الآن أنها تهاجم غير النباتات الراقية.

وإن جدول رقم ٥ يبين بعض الفروق بين الفيروسات والفيريونات والكانثات الدقيقة.

جدول رقم ٥ : بعض الفروق بين مسببات مرضية

الفيريونات	الفيروسات	الكانثات الحية الدقيقة	الصفة
لا يحدث نمو	لا يحدث نمو	يحدث فيها نمو	النمو
لا تنقسم	لا تنقسم	تنقسم	الانقسام
مطلقة التطفل	مطلقة التطفل	غير مطلقة التطفل	التطفل المطلق
RNA	DNA أو RNA	DNA و RNA	نوع الحمض النووي
$10 \times (1,3 - 1,1)$	$3 \times (10 - 100)$	أكبر من 3×10	الوزن الجزيئي للحمض النووي
غير مغلف	مغلف مع بعض الاستثناء	غير قابل للاستعمال	التغليف
لا تشفر	تشفر	تشفر	تشفير للبروتين

٢ - مقارنة بين الفيريونات والفيروسايدات:

Comperison of Viroids and Virusoids

تعتبر الفيروسايدات Virusoids من مرافقات RNAs النباتية. حيث أن هذه المرافقات تنقسم إلى مجموعتين:

المجموعة الأولى: مجموعة مغلفة توجد بشكل دائري مثل الفيريود ويوجد ضمن هذا الغلاف فيروس مساعد. ويوجد من هذه المجموعة أربعة أفراد معروفة وتسمى Virusoids (يعنى فيها RNA شبيه بالفيريود (Viroid - like RNAs) واعطيت هذا الاسم لتمييزها عن المجموعة الأخرى.

المجموعة الثانية: مجموعة مغلفة وتوجد بشكل مستقيم وتسمى مرافقات RNAs أو Satellite RNAs ويعرف من هذه المجموعة واحد فقط ويسمى sTRSV وقد درس جيداً.

جميع أفراد هذه المرافقات تتكاثر بميكانيكية الدائرة المتلفة. في حالة sTRSV الأشكال الدائرية تكون موجودة في النباتات المصابة ولكن فقط الشكل المستقيم هو الذى يختار ويكون مغلفاً مع جزيئات الفيروس.

إن مرافق RNA الحيوانى الوحيد والذى يشارك صفات الإنشطار الذاتى فى المعمل والمفترض تناسخه بالدائرة المتلفة والإنشطار الذاتى فى الطبيعة مثل المرافقات النباتية هو فيروس دلتا الكبد hepatitis ويسمى Hepatitis delta virus (HDV) RNA. وإن هذا ال RNA الدائرى يتكون من ١٧٠٠ نيوكليتيده وحجمه خمسة أضعاف RNA فى النبات ويكون مغلفاً على شكل أجزاء فيروسية منفصلة عن RNA الفيروسي.

ويبين جدول رقم ٦ مرافقات RNAs التى تخضع للإنشطار الذاتى.

جدول رقم ٦: مرافقات RNAs التى تخضع للإنشطار الذاتى			
النبات	الفيروس المساعد	الاسم بالاختصار	طول النيوكليوتيدات
١ - RNAs شبيه بالفيروسات مغلقة Virusoide	أ - فيروس التخطيط المتقل فى البرسيم الحجازى Lucerne transiend strak virus ب - فيروس التبرقش المتقل فى البطاطس Solanum nodiflorum mottle virus ج - فيروس تبرقش البرسيم الأرضى Subterranean clover mottle virus د - فيروس التبرقش النطيل فى الدخان Velvet tobacco mottle virus	vLTSV vSNMV vScMoV vVTMoV	324 377 332 & 388 365 - 360
٢ - RNA مستقيم مغلف	فيروس البقعة الحلقية فى الدخان Tobacco ringspot virus	STRSV - sTobTSV	359
٣ - الحيوان RNA دائرى مغلف للفيروس دلتا الكبد	Hepatitis B virus	HDV RNA	1,700

إن الصفات الخاصة للفيروسات يمكن ملاحظتها جيداً عند إجراء مقارنة مع جزيئات RNA الشبيهة بالفيروسات مثل الفيروساتيدات virusoids، الأحماض النووية RNAs الدائرية ذات الحجم المشابه المحتوى المائل من GC ولكن بشكل عشوائي مثل التابع المخلق بالكومبيوتر. إن تتابع النيوكليوتيدات والتركييب الثانوى لاثنين من الفيروساتيدات تختلف عن فيروساتيد VTMOV فيرس التبع المخلى (القيطفى) فى الدخان، وفيرس تبع نبات *Solanum nodiflorum* (SNMV). إن درجة تزواج القواعد يكون ٥٦٪ فى VTMOV و ٥٧٪ فى SNMV وقيمة متوسطة من ٥٧٪ حسب من أقرب ما يمكن من التركيب الثانوى لخمسـة تتابعات مختلفة عشوائية. هذا ويظهر أن درجة تزواج القواعد فى بعض الفيروساتيدات ٦٤٪ فى CCCVd ليست أعلى بكثير من الفيروساتيدات أو التتابعات العشوائية. إن غياب التشعبات صفة مميزة والتي هى من مميزات الفيروساتيدات. كذلك فإن هناك صفة مميزة أخرى هى الثبات التيرموديناميك، وهى إما أن توضح بواسطة $\Delta G/N$ أو بواسطة قيمة T_m . إن التعاون المثل بواسطة $\Delta T_{1/2}$ يكون فقط عال فى التراكيب المقطعية للفيروساتيدات. وأن تكوين دبوس الشعر الثابت خلال تكون تركيب مقطعى مترافق يحدث فقط فى الفيروساتيدات.

ماذا عن الفيروسات الحيوانية

Question of Animal Viroids

مع أن الفيروساتيدات قد عرفت تماماً بأنها تصيب النباتات الراقية، إلا أن هناك عوامل مشابهة قد توجد فى أشكال الحياة الأخرى. يبدو من المعقول البحث عن الفيروساتيدات فى كثير من الحالات التى فيها مسببات الأمراض يفترض أنها فيروسية ولكن العامل المسبب لم يتأكد تعريفه. وبكلمة أدق يمكن البحث عن الفيروساتيدات فى الأمراض التى يشك فى أنها تسبب عن فيروسات.

هناك أمراضاً كثيرة تصيب الإنسان والحيوان وتعزى إلى فيروسات ولكن العامل

المسبب الحقيقي مشكوك فيه، من هذه الأمراض، المرض شبه الحاد من التهاب الدماغ وبعض أمراض التهابات المفصليّة، ومرض سكرابيا Scrapie في الحيوانات، يشك في أنها تتسبب عن فيروسات.

على أساس مقارنة الصفات المعروفة عن فيروس PSTVd وصفات العامل المسبب لمرض سكرابيا تبين من ناحية نظرية أنه يتسبب عن فيروس، لكن من ناحية عملية لم يثبت بشكل قاطع أنه يتسبب عن فيروس.

إن المحاولات التي بذلت لعزل الحمض النووي المعدى من عينات الدماغ التي أخذت من الحيوانات المصابة بالمرض باءت بالفشل. كذلك فإن الادعاءات التي تقول إن هناك DNA منخفض الوزن الجزيئي مكون أساسي وضروري لظهور أعراض مرض سكرابيا لم تتأكد. ومن ناحية أخرى فإن هناك أدلة مقنعة على أن وجود hydrophobic protein في العامل المسبب للمرض يكون أساسياً للتعبير عن حيوية العامل الممرض. إلا أن نفس الباحثين لم يكونوا قادرين على إثبات المتطلبات الضرورية من الحمض النووي لإحداث المرض.

لقد ذكر كثير من الباحثين أن مرض سكرابيا هو محل خلاف كبير. إن مسبب المرض شديد العدوى، ثابت ظاهرياً، غير صعب في تنقيته ويبدو أنه مقاوم للإجراءات العادية لتنقية العوامل المعدية. ولقد ذكر أن هناك أدلة وافرة لثبات سلالاته الوراثية مع المتطلبات التالية من جينوم حمض نووي. وعلى أية حال فإن المحاولات للتأكد المطلق من وجود أو عدم وجود الحمض النووي في المادة المنقاه جيداً لحد الآن لم يكتب لها النجاح.

عند مقارنة العامل المسبب لمرض سكرابيا مع الفيروسات من حيث صغر الحجم والمقدرة على إحداث أعراض واضحة في العوائل القابلة للإصابة، والوقت الطويل الذي يحتاجه بالمقارنة مع الفيروسات، أصبح هناك احتمالاً من أن يكون عامل المرض يحوى على جينوم شبيه بالفيروس.

إن الصعوبة في اكتشاف حمض نووي في تحضيرات سكرابيا المختلفة النقية يمكن أن يكون راجعاً إلى الوزن الجزيئي المنخفض جداً لجينوم سكرابيا. وإذا كان هذا المسبب المرضي يتكون من جزيء دائري ٥٠ نيوكليتيده، فإن تناسخ الدائرة الملتفة لهذا ال RNA سوف يولد جزيئات concatameric والتي يمكن أن تكون الشكل الوظيفي للمادة الوراثية. زيادة على ذلك فإن الانشطار الذاتي الجزيئي لهذه ال concatamers يمكن أن تولد جزيئات أصغر بأطوال مختلفة كل منها ينجز وظيفة مختلفة إلى حد ما بسبب اختلاف الطول.

بعد كل هذا من الممكن أن نتخيل جزيء RNA دائري صغير جداً يبدو قادراً على إحداث تأثيرات Phenotypic معنوية كتتابعات لتكاثر concatameric RNAs مختلفة، مثل هذه ال RNAs يمكن أن تتداخل مع العمليات الطبيعية الخلوية بطرق مشابهة لتلك التي تقوم بها الفيروسات. إن جميع المعلومات المتوفرة عن مسبب مرض سكرابيا تسمح بأن يكون من ناحية نظرية فيروس، ولكن هذا التأكيد يحتاج إلى أبحاث طويلة حيث أن العمل على هذا المسبب قد بدأ في سنة ١٩٧٤ ولغاية ١٩٩٢ لم يتأكد الموضوع.

فرضية Diener: هل الفيروسات مستحاثات (بقايا) جزيئ من عالم RNA

Are Viroids Molecular Fossils of the RNA World

لقد تقدم العالم Diener سنة ١٩٨٩ بفرضية يقول فيها إن الفيروسات عبارة عن مستحاثات أو بقايا جزيئ من عالم RNA. وإن هذه الفرضية لاقت معارضات كثيرة من قبل كثير من الباحثين، إلا أن هناك من وافق عليها وقدم الأدلة والبراهين على صحتها. وفيما يلي نعرض التقرير الذي تقدم به J.C.Flores سنة ١٩٩٤ وفيه يؤكد صحة فرضية Diener ويدعمها بالبراهين والاثباتات.

تقرير العالم J.C.Flores :

نحن نناقش اعتراضاً قد ارتفع ضد فرضية العالم Diener والذي يقول فيها أنه يمكن تفسير ظهور الفيروسات على أنها جزء مستحث من عالم RNA. نحن سلكنا طريقاً سليماً لازالة مثل هذا الاعتراض ونكون بذلك قد عضدنا وساندنا فرضية Diener. وعلى أية حال فإن استنتاجاتنا تستلزم زيادة في العمل من قبل علماء أمراض النبات في هذا الموضوع. يبدو أن هذه الفرضية لها أهمية من ناحية بيولوجية ومن ناحية تطورية.

مقدمة :-

١ - عالم RNA :

هناك بعض الافتراضات التي وضعها كثير من العلماء حول عالم RNA وكانت هذه الافتراضات ناجحة في كثير من الحالات وقد قمنا بتلخيص هذه الافتراضات وهي كالآتي :-

أ - ازدواجية الفينوتايب والجينوتايب لـ RNA :

إن هذه الجزيئات الكبيرة جداً من RNA تعتبر بأنها تقوم بالعملين في تجارب تطور الخلية الحرة. إن تتابع النيوكليتيده في القواعد يكون ال Genotype، بينما التركيب الفراغي أو الحيزي لجزئ ال RNA هو ال Phenotype، ويمكن الاستفادة من الشرح الذي ذكر عن التركيب الثالثي Tertiary المعروف جيداً لـ tRNA مع الانتيكودونات Anticodons.

ب - التطور لأنواع ظاهرية إلى حد ما جديدة على طول أنابيب الجيل يزودنا بأمثلة من الحيز الاختياري Spatial selection في أعمال كثير من العلماء.

ج - إن التراكيب الذاتى Self - Splicing في Protozoan genomes يمكن أن يفسر كأنه بقايا من عالم ال RNA، ومن الضروري أن نذكر في هذا

المجال أنه عند تتبع سلسلة مراحل التطور، هذا يؤدي إلى التعرف على أصل الحياة وإن عالم RNA اعتماداً على هذه المعلومات يظهر أنه قد تطور متأخراً. يمكن القياس على أعمال العالم De Duve سنة ١٩٩١ عندما بحث في عالم Thioester وعالم ال Pyrophosphate. وعلى أية حال إذا تركنا المراحل الأولى من عالم ما قبل النيوكليتيده إلى عالم النيوكليتيده، فمن الممكن أن نلمح إشارات مفيدة لا يزال يستدل بها على مستحاثات الجزئ موجودة في الخلايا المعاصرة.

٢ - إن ال RNAs المعرضة للنهايات يمكن أن تكون بقايا من التطور ما قبل الخلوى:

في هذا المجال يمكن أن نقوم بتلخيص إقتراحات العالم Diener والتي يقول فيها إن ال RNAs الممرضة للنبات تتصف بأنها دائرية صغيرة يمكن أن تكون بقايا من التطور ما قبل الخلوى. ونؤكد هذا الكلام بقولنا إن الفيروسات قد درست جيداً خاصة تلك التي لها أهمية في الزراعة منذ ظهور تأثيرها الأول على العائلة الباذنجانية خاصة *Solanum tuberosum* (البطاطس)، فمثلاً إن أول فيروس عرف هو فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس PSTVd وفيه ٣٥٩ نيوكليتيده (Diener 1971). وإن أول تتابع للنيوكليتيدهات الكاملة في الفيروس قد حدد أيضاً في PSTVd سنة ١٩٧٨ من قبل العالم Gross.

من هذا يتبين أن هناك ثقة واسعة لصالح تفسير الفيروسات كجزئ مستحاث. بعد ذلك ظهر هناك آراء معارضة كثيرة تفند هذه الفرضية وتطلب توضيحاً على استفساراتها. وقبل أن نذكر الآراء المعارضة فإننا نقوم بتوضيح بعض النقاط التي تدعم البراهين التي تؤيد بأن الفيروسات هي بقايا من عالم RNA هذه النقاط هي:-

أ - طول الفيروسات القصير ٢٤٦ - ٣٧٥ نيوكليتيده.

ب - بعض الفيروسات يحدث فيها ظاهرة الانشطار الذاتي الذى فيه تحدث ظاهرة مثيرة للاهتمام. إن أنزيمات العائل RNase لا تتدخل. فعلاً فإن عملية الانشطار الذاتي تحدث فى الغياب الكامل للبروتينات. ومن ناحية أخرى ففي حالة الفيروسات غير ذاتية الانشطار، فإن بعض العوامل أو الوسماء تتدخل فى ذلك. من الممكن أن يكون RNase تنزود به الفيروسات من قبل خلايا العائل.

ج - إن البناء الداخلى للفيروسات يعطيها ميكانيكية دفاعية، نظراً لأنها تتكون من دوائر أحادية الخيط مع وجود ازواج قواعد عديدة تسمح لهذا ال RNA ليشكل حلزون ثنائى كامل بأبعاد تجعل الفيروس مقاوم للأشعة UV.

د - إن تتابع النيوكليوتيدات فى الفيروسات يبرز قليلاً من النشاط لـ RNA أو لا يظهر أى شئ من هذا النشاط فى الفيروس PSTVd، فمثلاً هناك stop codons متكررة فى كل القراءات للآطار العام للفيروس.

الآراء المعارضة لنظرية Diener والرد عليها

١ - التناقض الظاهرى لهذه الفرضية:

هناك تناقض ظاهرى ينشأ من الفرضية التى تقول بأن الفيروس قد يكون جزئ مستحاث من عالم RNA. إن الفيروسات فى إحداثها المرض متخصصة مع نباتات مغطاة البذور فقط. إن هذه النباتات قد ظهرت فوق سطح الأرض فى العصر الطباشيرى فمن المفترض حسب رأى Diener أن الفيروسات يجب أن تكون ظهرت مع مغطاة البذور منذ تلك الفترة، ولكن هذا لا يؤيده الواقع.

إن أقدم مستحاثات لمغطاة البذور يؤرخ من نهاية العصر الجيولوجى المتوسط ١٠٠ - ١٤٠ مليون سنة قبل ظهور الأوراق الحالية وجيوب اللقاح الحالية. كذلك فإن

التقارير التي تتكلم عن أجزاء التكاثر في مغطاة البذور تؤرخ من العصر الطباشيري المتأخر وهي في فترة Turonian ، كذلك فإن الترسبات القديمة للنباتات المتحجرة كانت قبل العصر الطباشيري وبعده بمدة طويلة جداً أنتجت تركيبات تكاثرية. وبالتالي فإن عالم ال RNA قد ظهر أولاً على الأقل في الدهور السحيقة إذا لم يكن قبل ذلك. اعتماداً على هذا الكلام فمن المفروض أن الفيرويدات بقايا من الدهور السحيقة (3.9 - 3.3 Gybp) ، إلا أن الأقرب للصحة أنها متخصصة للحياة في فترة العصر الطباشيري وخاصة على مغطاة البذور.

لرد على هذه المعارضة يجب أن نطرح السؤال التالي.

أين كانت هذه الأجزاء المحفوظة على حياتها منذ الدهر السحيق قبل أن تصبح متخصصة على النباتات في العصر الجيولوجي المتوسط نسبياً؟؟.

مع أن طرق إحداث المرضية من قبل الفيرويدات ليست واضحة تماماً، إلا أن إحدى هذه الطرق الممكنة وقد اعتمدها كثير من الباحثين وهي إحداث تغير في مستويات البروتين في خلية العائل قد يكون مسؤولاً عن إحداث الأعراض عند الإصابة، أو يمكن أن يحدث تحورات في البروتين بعد نسخه في خلية العائل، فمثلاً، بواسطة عملية Phosphorylation. إن الاحتمالين المذكورين سابقاً، إلى حد ما، قد يكونا من خصائص البكتيريا الزرقاء كطور من مراحل الحياة الحرة لبدائيات النواة، إلا أن هذا لم يتأكد حتى الآن، ولكن الذي تأكد هو أن الفيرويدات متخصصة في خلايا النبات الذي فيه الكلوروبلاست عبارة عن عضيات organelles نشأت من البكتيريا الزرقاء عن طريق التكافل. نحن نتذكر هذا الافتراض ونعتمد عليه بالاعتماد على نظرية التكافل الداخلي المتسلسل Serial endosymbiosis theory ، بأن بعض الكلوروبلاست نشأت خلال مراقبة ال polyphyletic بين البكتيريا الزرقاء المختلفة أسلاف خلايا مميزة النواة.

٢ - البحث عن البكتيريا الزرقاء المميزة:

فى هذا الموضوع، بين الاختيارات المختلفة المتوفرة فى البحث عن البكتيريا الزرقاء المميزة يجب أن نذكر أن صفة الفيروسات ذات التضاعف الموجب بسبب أنزيمات العائل تؤدي إلى الاقتراح بأن Cyanobacteria RNA replicase قد استكشف من وجهة النظر هذه (هذا يعنى أن RNA - polymerase المعتمد على RNA الذى يمكن أن يكون مستولاً عن تضاعف الفيروس، من الآن فصاعداً نشير إلى هذا البروتين باسم العامل X. نحن لا نملك إلا القليل من المعلومات عن طرق تناسخ البكتيريا الزرقاء باستثناء الهستونات شبيهة بالبروتينات ذات الحجم المشابه لبروتين HU فى E. coli.

لكى نرد على هذا الاعتراض يجب أن نستذكر تسلسل فرضيات التكافل الداخلى Endosymbiosis. يجب أن نفترض أن الاسترقاق Holobionts (متكافل Symbionts وعائل hosts) الأول يستفيد من العائل ولا يقدم للعائل أية فائدة، هى أهداف جديدة للانتخاب الطبيعى بسبب التداخل بين المشاركين فى التكافل، فى هذه الحالة فإن المشارك قوة رائدة مهمة جداً فى التطور، وهذا دعم بأسانيد قوية من كثير من الباحثين. مثل هذا التداخل بين العوائل والمتكافلين يمكن، مثلاً، أن يكون إنتقال وراثى أو متكافل مشارك مثل العضيات Organelles. نرجع ثانية إلى العلاقة مع الفيروسات فإن الاحتمالات المتوقعة والقائمة تكمن فى:

بعض الانزيمات المعروفة فى نسخ الفيروسات مثل (QB replicase). بعض التكافل بين الخلايا البكتيرية التى تمتلك فعلاً جينومات مخفضة، فمثلاً الكائن Cyanophora paradoxa وحيد الخلية ذو أسواط، يوجليتا تأوى Cyanelles والتى تكون مثل البكتيريا الزرقاء متكافل ينقصه جدران الخلية وتكون له كلوروبلاست عاملة. ولقد عرفت ال Cyanelles بأنها تمتلك ١٠٪ فقط من

محتويات ال DNA فى البكتيريا الزرقاء غير المتكافئة. هذه المتكافلات الداخلية من بدائية النواة يمكن أن تقترب من الطور الذى وصل إليه بواسطة الكلوروبلاستس الذى يرجع بناء بروتينها الذى فصل. ولكن كثيراً من هذه البروتينات شفت بواسطة جينات نووية.

والذى يهمننا هنا احتمال واحد ومهم أن نذكره هو أنه فى فرضيتنا أن-Viroid Containing cyanobacteria وتكاثر الفيروس يكون بسبب العامل X، بعد التكافل فإن الفرد المتكافل يمكن أن يمتلك جينوم أصغر كثيراً كما فى Cyanelles. الفيروسات يجب عليها أن تعتمد على جينوم المائل لبناء عامل X.

هذه إثباتات نظرية وبقي على علماء أمراض النبات أن يثبتوا ذلك عملياً بالتطبيق على أمراض النبات والعوائل القابلة للإصابة منذ العصر الجيولوجى الأول إلى هذا الزمن.

مراجع خاصة بالفصل الثاني

- 1 - Agrios, M. J. 1987. Plant Pathology. Acedemic Press. 800 pp.
- 2 - Branch, A. D., Robertson, H. D., Dickson, E. 1981. Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A. 78: 6381 - 6385.
- 3 - ——— A. P., ——— 1984. Science 223 : 450 - 455.
- 4 - Bruening, G. et al. 1982. FEBS Lett. 148 : 71 - 78.
- 5 - Diener, T. O., Smith, D. R. 1975. Virology 63 : 421 - 427.
- 6 - ——— , ——— 1989. Proc. natn, Acad. Sci U. S. A. 86 : 9370 - 9374.
- 7 - D. Duve, C. 1991. Blueprint for a cell: The nature and origin of life, Neil Patterson Publishers.
- 8 - Grill, L. K., et al. 1980. Virology 107 : 24 - 33.
- 9 - ——— , ——— , Semancik, J. S. 1978. Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A. 75 : 896 - 900.
- 10 - Gross, J. H., Dornedy, H., Lossow, C. 1978. Nature 273 : 203 - 208.
- 11 - ——— , ——— , ——— 1981. Biosci, Rep., 1 : 235 - 241.
- 12 - Hadidi, A., Cress, D. E., Diener, T. O. 1981. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 78 : 6932 - 6935.
- 13 - Haseloff, J., Symons, R. H. 1981. Nucleic Acids Res. 9 : 2491 - 2452.
- 14 - Lewin, R. 1981. Science 213 : 634 - 636.
- 15 - Meshi, T. et al. 1984. J. Biochem., 95 : 1521 - 1524.

- 16 - Muhiabach, H. P., Sanger, H. L. 1979. Nature 278 : 185 - 188.
- 17 - Ohne, T., Takamatsu, N., Meshi, T., Okado, Y. 1983. Nucli Acid Res. 11 : 6185 - 6197.
- 18 - Owens, R. A., Cress, D. E. 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 5302 - 5306.
- 19 - Owens, R. A., Diener, T. O. 1981. Science 213 : 670 - 672.
- 20 - Rackwitz, H. R., Rohde, W., Sanger, H. L. 1981, Nature 291 : 297 - 301.
- 21 - Riesner, D., et al. 1979. J. Mol. Biol. 133 : 85 - 115.
- 22 - Semancik, J. S., Tsurnda, O., Zaner, L. 1976. Virology 47 : 456 - 466.

الفصل الثالث

الدراسات الحديثة للفيروسات

تصنيف - نطاقات - تنوع التتابع وتشخيص الفيروسات

classification - Domains - Sequence Variants and Diagnosis of Viroids

أولاً: - تصنيف الفيروسات : Classification of Viroids

ظهرت آراء كثيرة فيما يتعلق بتصنيف الفيروسات وسواء صنف الفيروسات تحت الفيروسات أم لا فإن ذلك يعتمد على التعريف الدقيق والمقبول لكلمة فيروس Virus. وبالتالي فإن التعريف الذى ذكر فى الطبعة الثالثة من كتاب General Virology الصادر سنة ١٩٧٨ لمؤلفه Luria et al والذى يرى فيه أن التركيب الذى أقل من الخلية والذى يمتلك طور حيوى معدى يتمثل بشكل خاص فى الفيروسات وهذه الفيروسات تنتج تحت نظام وراثى لا يختلف عنه فى الفيروس، والنظام الوراثى فى الفيروس يختلف عنه فى الفيروس، اعتماداً على ذلك فإن الفيروسات لاتقع فى هذا المجال من التعريف وبالتالي لا تدرج فى التصنيف تحت الفيروسات.

ومن ناحية أخرى فإن العالم Lwoff سنة ١٩٨١ يرى أن الفيروسات هى كائنات ذات قدرة حيوية على إحداث العدوى وذات قدرة على إحداث المرض وهى طفيليات مطلقة بكل ما فى الكلمة من معنى. وقد أكد فى تعريفه للطفيليات المطلقة على أنها تلك الطفيليات التى تستخدم النظم الأنزيمية لخلايا

عوائلها فى إنتاج الطاقة (نظام Lipmann) وبناء البروتين وتستخدم رايوسومات خلايا العائل وكذلك tRNAs للعائل. حسب هذا التعريف فإن الفيروسيدات تكون فيروسات بشكل واضح.

بغض النظر عن أى من هذين التعريفين هو الأصح، إلا أن هناك إختلافات واضحة بين الفيروسات التقليدية والفيروسيدات. مع أن العالم Lwoff ذكر فى تعريفه للفيروسيدات بأنها أنواع من الفيروسات، إلا أنه اقترح تقسيم مملكة الفيروسات إلى مجموعتين، الأولى الفيروسات الحقيقية The True Viruses أو Euviruses والثانية الفيروسيدات Viroids.

إن العالم Lwoff اعتمد فى تقسيمه على درجة وطبيعة التطفل ولم يضع فى اعتباره عمق الاختلافات بين الفيروسات والفيروسيدات. من الملاحظ أنه إذا كانت الفيروسات طفيليات مطلقة فى رأى العالم Lwoff، فمن الممكن اعتبار الفيروسيدات فوق التطفل المطلق Ultra - absolute parasites (يعنى أكثر من تطفل مطلق)، وذلك لأنها تعتمد إلى حد بعيد وكبير (زيادة عن الفيروسات) على آلية البناء الحيوى لخلايا عوائلها. مع أن الفيروسات تحتوى بشكل ثابت معلومات وراثية والتي بمساعدة النظام البنائى لبروتين العائل فإنها يمكن أن تترجم (فى طور واحد أو أكثر من دورة تضاعف الفيروس) إلى واحد أو أكثر من البروتينات الخاصة بالفيروس، إلا أن الفيروسيدات يبدو أنها لا تمتلك هذه الكفاءة. وبالتالي فإن الفيروسيدات حتى يحدث لها تضاعف فإنها يجب أن تعتمد كلية على أنزيمات موجودة بشكل طبيعى فى خلايا عوائلها. وبالتالي يمكن القول بأن الفيروسيدات هى الكائنات الممرضة الوحيدة المعروفة التى لا تعمل شفرة لأى بروتينات.

بعد تلك المناقشة مع العالم Lwoff تبين له ضعف وعدم دقة إقتراحه بتصنيف الفيروسيدات كأنها فيروسات وزاد هذا الاقتراح ضعفاً عند معرفة التركيب الجزيئى الفريد والغريب للفيروسيدات والذي ليس له نظير بين الفيروسات، هذا التركيب الذى جعل أى علاقة تطورية بين هذين الكائنين الممرضين الفيروسات والفيروسيدات فى قصص الاتهام.

يعتبر التابع القاعدة الأساسية لمقارنة الفيروسات (تتابع النيوكليوتيدات في خيط الـ RNA) مع بعضها البعض. إن تابع المنطقة المركزية المحفوظة يسمح لجميع الفيروسات الموصوفة (التي درست) بأن تصنف إلى أربعة مجموعات. الاختلاف الذى يقع ضمن كل فيروس ينسب إليه الأنواع وإن الأساس الذى يعتمد عليه فى التفريق بين التنوع Variants والنوع Species، هو أنه فى التنوع يكون هناك تشابه فى التابع بحدود ٩٠٪، أما فى النوع Species فإن تشابه التابع يكون أقل من هذا المستوى.

إعتماداً على هذا الأساس من التقسيم صنف الفيروسات إلى مجموعتين رئيسيتين وثلاثة تحت مجموعة.

لقد وضع Koltunow & Rezaian سنة ١٩٨٩ أساس تصنيف الفيروسات اعتماداً على مقارنة تحليل التتابعات فى الفيروسات ويوصى باستعمال جدول رقم ٧. حيث تقسم الفيروسات إلى مجموعتين رئيسيتين A و B وإن فيروس ASBVd هو الذى يمثل فى مجموعة A، لأن هذا الفيروس لا يظهر بشكل أساسى أية علاقات تتابع مع أى من الفيروسات الأخرى، مع أنه من المعقول جداً أن هناك أفراداً أخرى من هذه المجموعة (وقد وضع فيروس الموزايك الكامن للخوخ فى هذه المجموعة) وسوف تكتشف أفراداً أخرى مستقبلاً.

تقع الفيروسات الأخرى كلها ضمن المجموعة B والتي تسمى مجموعة Pospirovirids. هذه المجموعة يمكن أن تقسم إلى ثلاثة تحت مجموعات هى B₁، B₂، B₃. إن تحت المجموعة B₁ يمثلها الفيروس PSTVd وتحتوى ١٥ فيروس بدأت معرفة أولها منذ عشرين عاماً، مع أن بعضاً منها مثل CLVd، CTIVd قد عرف تتابعها حديثاً سنة ١٩٨٨ - ١٩٨٩. كل هذه الفيروسات تمتلك تتابع محفوظ وصفات تركيبية فى القمة المركزية للخيط فى جزئ الفيروس. أما تحت المجموعة B₂ الذى يمثلها ASSVd وتسمى مجموعة Apscavirovirids فهى تحتوى ثمانية فيروسات والتي قد وصفت حديثاً. هذه الفيروسات تشارك فى مسافة (قطعة) كبيرة من تماثل التابع خاصة ضمن المنطقة المركزية لجزئ الفيروس والذى هو الأساس فى وضعها فى مجموعات.

إن أحدث الفيرويدات وصفاً هو فيرويد (Columnea blumei Viroid) CbVd وهو أيضاً واحداً من أصغر الفيرويدات به ٢٤٨ نيوكليتيده (اكتشف سنة ١٩٩٠ يصيب الكوليس. إن تنابعه غير متعلق بشكل أساسي مع أى من الفيرويدات، ولكن صفات منطقته المركزية تشابه لتلك الصفات الموجودة في عدد من أفراد تحت المجموعة B₁، B₂ وبالتالي فإنه وضع في تحت مجموعة جديدة هي B₃.

جدول رقم ٧ : تصنيف الفيرويدات

مجموعة الفيرويد	تحت مجموعة الفيرويد	اسم الفيرويد بالتصنيف	اسم الفيرويد مختصر	عدد التبرعات/المرات في الفيرويد
مجموعة A أو Avaruviroids	تحت مجموعة ASBVd	Avocado Sunblotch Viroid	ASBVd	٢٤٧ (٢٥٠ - ٢٥١)
		Peach Latent Mosaic Viroid	PLMVd	٢٢٧
مجموعة B أو Pospoviroids	تحت مجموعة B1 أو تحت مجموعة PSTVd	Potato Spindle tuber Viroid	PSTVd	٢٥٩
		Citrus Exocortis Viroid	CEVd	٢٧٠ - ٢٧٥
		Citrus Viroide	CVd	٢٧٥ - ٢٨٠
		Coconut Cadang - Cadang Viroid	CCCv	٢٤٦ - ٢٤٧
		Coconut Tinangaja Viroid	CTIVd	٢٥٤
		Chrysanthemum Stunt Viroid	CSVd	٢٥٤ - ٢٥٦
		Chrysanthemum Chlorotic Mottle V.	ChCMVd	—
		Hop Stunt Viroid	HISVd	٢٩٧ - ٢٠٢
		Hop Latent Viroid	HLVd	٢٥٦
		Tomato Planta Macho Viroid	TPMVd	٢٦٠
		Tomato Apical Stunt Viroid	TASVd	٢٦٠
		Tomato Bushy Top Viroid (Indiana)	ITBTv	٢٧٢
		Cucumber Pale Fruit Viroid	CPFVd	٢٩٧
		Nematanthus Viroid	CLVd	٢٧٢
		Columnea Latent Viroid	CLVd	٢٧٠
مجموعة Apscaviridae	تحت مجموعة B2 أو تحت مجموعة ASSVd	Apple Scar Skin Viroid	ASSVd	٢٣٠
		Dapple Apple Viroid	DAVd	٢٣٨
		Apple Fruit Crinkle Viroid	AFCVd	٢٤٠
		Pear Blister Canker Viroid	PBCVd	٢١٥
		Citrus Bent Leaf Viroid	CBLVd	—
		Australian Grapevine Viroid	AGVd	٢٢٩
		Grapevine Yellow Speckle Viroid - 1	GYSVd-1	٢٢٧
		Grapevine Yellow Speckle Viroid - 2	GYSVd-2	٢٢٣
	تحت مجموعة B3	Coleus Yellow Viroid	CVd	٢٤٨
		Coleus Blumei Viroid	CbVd-1	٢٤٨

ملاحظات:

- ١ - فيرويدات الحمضيات لها تصنيف لوحدة في الجزء الثاني من الكتاب.
- ٢ - الفيرويد المسبب للثمرة الباقية في الحماض، تفرق الثمرة في الحماض والبرقوق يفرق من الحمضيات والحب.
- ٣ - بعض فيرويدات الثمرة الباقية في الحماض تنوع تابع الفيرويد حشيمة الحماض.

بالإضافة إلى الفيروسات المذكورة في جدول رقم ٧ هناك عدة فيروسات تحت الدراسة وهذه الفيروسات هي:

- | | |
|---------------------------------------|---|
| 1 - Burdock stunt Viroid. | 7 - Privet Viroid. |
| 2 - Pear Rusty Skin Viroid. | 8 - Oil Palm Fatal Viroid. |
| 3 - Apple Scar Skin latent Viroid. | 9 - Pigeon Pea Mosaic Mottle Viroid. |
| 4 - Nicotiana glutinosa Strnt Viroid. | 10 - Dapple Fruit Viroid of Plum and Peach. |
| 5 - Carnation stunt Viroid. | |
| 6 - Wheat Leaf Blight Viroid. | 11 - Nematanthys Viroid. |

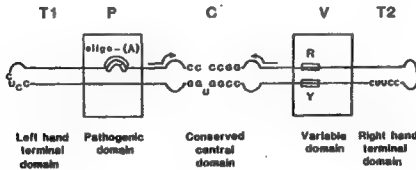
إن تحليل مقارنة التتابع في النيوكليوتيدات لتسعة عشر فيروساً قد تم تحديد تنابعاتها وهذا يسمح بتصنيفها إلى مجموعتين كبيرتين. مجموعة A تحتوي فرد واحد لغاية سنة ١٩٩٢ وهو فيروس ضربة الشمس في الافوكادو ASBVd وهو ثاني أصغر الفيروسات المعروفة وهو الوحيد لغاية ١٩٩٢ الذى يحدث له إنشطار في المعمل ثم أضيف إليه فيروس آخر. الفيروسات الباقية في مجموعة B ونسبى مجموعة PSTVd - group B وهذه تقسم إلى تحت مجموعات ثلاثة هي PSTVd sub group B₁ - والثانية B₂ - sub group ASSVd - والثالثة B₃ - sub group CBVd.

الأسس التى بنى عليها تصنيف مجموعة B هي وجود تنابعات محفوظة في الجزء المركزي لجزيء الفيروس. في نموذج النطاق للفيروسات شكل ٧، فإن جميع جزيئات الفيروس في PSTVd مجموعة B يكن أن تقسم إلى خمسة نطاقات هي T₁، C، V، T₂. وإن حدود هذه النطاقات قد حددت بواسطة مقارنة التتابع للفيروسات في أزواج. إن التغيرات الشديدة في تماثل التتابع من الأعلى إلى الأقل أو العكس يبين مواقع الحدود والتي كانت دائماً ثابتة مع مقارنة الأزواج المختلفة. إن نموذج النطاق كان قد تكشف باستعمال تنابعات الفيروس فقط من تحت مجموعة B₁ - PSTVd بسبب أن أفراد هذه المجموعة كانت

متوفرة في ذلك الوقت. وعلى أية حال فإن فيرويدات تحت المجموعة B_2 التابعة لـ ASSVd أيضاً تمتلك نفس النطاقات كما حدثت بواسطة نفس البحث وهو المقارنة الزوجية لتماثل التابع.

إن تحت مجموعة B_2 من ASSVd قد فصلت عن تحت مجموعة B_1 على أساس التابع في نطاق C. إن المنطقة المحفوظة المركزية ضمن نطاق C لكل تحت مجموعة فيها تناهات بحوالي ٣٠ نيوكليتيده وهي محافظ عليها بشكل كبير بين جميع أفراد تحت المجموعة والتي تمثل حوالي ثلث مجموع النيوكليتيديات في نطاق C. بشكل أساسي لا يوجد هناك تماثل بين هذه الثلاثين أو ما يقاربها في تحت المجموعتين وهذا يشكل الأساس في تحت التقسيم. أما تحت مجموعة B_3 فهي لا تزال تحت الدراسة وتشمل فيرويدين.

يؤدي نموذج النطاقات إلى الاقتراح بأن نشوء الفيرويدات يشمل إعادة ترتيب النطاقات بين الفيرويدات المهاجمة لنفس الخلية. سوف نتكلم عن النطاقات بالتفصيل في صفحات لاحقة إن شاء الله.



شكل رقم ٧:

نموذج لخمس نطاقات في مجموعة PSTVd. حدود نطاقات T_1 , C , P , V , T_2 محددة بتغير ملحوظ في تماثل التابع في أزواج القواعد بين الفيرويدات. الأسهم تدل على التابع المتكرر المقلوب والذي يمكن أن يشكل ساق ديبوس شعر مكون من تسعة قواعد زوجية. هذا ديبوس الشعر رقم واحد.

فيروسات مجموعة PSTVd :

هناك ١٥ فيروساً معروفاً وحددت تنابعاتها بالتفصيل في هذه المجموعة، تقسم هذه الفيروسات إلى ثلاثة تحت مجموعات (جدول ٧) وذلك مبنياً على تحليل التابع المقارن للمنطقة المركزية لكل جزيء. إنه من المحتمل أن يكون هناك أكثر من تحت قسم Subdivision ضمن كل تحت مجموعة، يمكن أن يكون هذا أكثر احتمالاً كلما زاد عدد الأفراد ضمن كل تحت مجموعة ووصفت جيداً. فمثلاً CCCVd وCTiVd مع أنها تشترك فقط في 7.6٤ من عموم تماثل التابع، إلا أنها متقاربة جداً إلى حد ما على أساس كل من التابع وتنظيم التابع، صغر حجم جزيئات الفيروس، المدى العائلي المحدود في عائلة النخيل ومستوى منخفض من تماثل التابع الكلي مع الفيروسات الأخرى من تحت المجموعة الخاصة بها. هناك أمثلة أخرى في تحت مجموعة B₁ ليس محددة جيداً أيضاً.

كما سبق وقلنا فإن تقسيم أفراد هذه المجموعة إلى ثلاثة تحت مجموعات قد اعتمد على النطاق الفيرويدي Domain.

مميزات مجموعة ASBVd . فيروس ضربة الشمس في اللافكادو:

بالإضافة إلى عدم وجود تشابه من حيث التابع والصفات التركيبية مع الفيروسات الأخرى، إلا أن هناك صفات أخرى مميزة، هي مقدرة كلتا الخيطين الموجب والسالب للحمض RNA للفيروس ASBVd لأن يخضع إلى تفاعل كامل من التقطيع الذاتي والذي يعتبر بأنه يلعب دوراً أساسياً في تناسخ الدائرة الملتفة لهذا الفيروس. يحدث تفاعل التقطيع الذاتي هذا في المعمل على مواقع معينة (لكنها مختلطة) في الحمض النووي RNA السالب والموجب في الغياب الكامل للبروتين، ولكن في وجود Mg^{++} يعطي RNA مقطع بنهايات من- 3', 2' cyclic phosphate و 5'-hydroxyl. شكل (٥). أما في المعمل فإن تفاعل التقطيع يعتبر هو المسئول عن تقطيع ال monomers السالب والموجب من التكرار الترادفي لـ monomeric الخيوط السالبة والموجبة والتي تنتج باستمرار خلال تناسخ الدائرة الملتفة.

إن الميزة الهامة للتقطيع الذاتي للفيروس ASBVd السالب والموجب والذي يشارك بواسطة أربعة فايروسايدات معروفة (الدائرية، شبه الفيروس، RNAs التوابع) و RNA الموجب للحمض RNA التابع لفيرس البقعة الحلقية فى الدخان، هى وجود ١٣ نيوكليتيده محفوظة والتي يمكن أن ترتب فى تركيب يشبه رأس المطرقة (شكل ٦) حول منطقة التقطيع الذاتي.

التركيب المجمع لشكل ٦ يحتوى ١٣ نيوكليتيده محفوظة (شكل صندوق) مع سيقان مكونة من ثلاثة أزواج من القواعد كما هو فى الشكل تأخذ I ، II ، III ، حول منطقة مفتوحة مركزية تحتوى على شريط واحد من RNA. هذا التركيب نشأ من تسعة RNAs ذاتية القطع والتي وصفت لغاية الآن والذي يكون التقطيع الذاتي خلال تركيب رأس المطرقة هذا.

إن التركيب ثنائى الأبعاد لا يفسر بوضوح تفاعل القطع الذاتي الخاص العال. يمكن الاعتقاد بأنه فى وجود Mg^{++} يتكون تركيب ثلاثى نشيط والذي يسمح بالخفض فى الطاقة التنشيطية فى نقطة التقطيع الذاتي، وبالتالي فإن تفاعل نقل الفسفرة شكل ٥ يمكن أن يحدث. مع أن تفاعل القطع الذاتي من ناحية نظرية منعكس إلا أنه لم يلاحظ إطلاقاً مع الفيروس ASBVd. الممكن إفتراضه أنه طالما تحدث عملية الانشقاق الذاتي فإن التركيب الثالثى المنشط يستمر (يرتخى) وبالتالي فإن نهايات 3'، 5' لا تكون أطول من مجاوراتها ولا يحدث التفاعل العكسى.

من الممكن التنبؤ بأن أفراداً جديدة لمجموعة ASBVd (كما هى قد أكتشفت) سوف تحتوى تنابعات عامة وصفات تركيبية واحداً منها سيكون كلا الشريطين السالب والموجب فى RNAs ليتقطع ذاتياً خلال تركيب رأس المطرقة. لا يوجد أى فرد من فايرويدات مجموعة PSTVd يمتلك بشكل مقنع صفة الانشطار

الذاتي، ولكن هناك فقط محاولات محدودة أجريت لغاية الآن للبحث عن مثل هذا التفاعل. يبدو من المحتمل تماماً أن هذ الفيروسات سوف تكون أيضاً ذاتية الانشطار ولكن سوف يكون عن طريق ميكانيزم مختلف نظراً لأن تركيب رأس المطرقة يحتوى ١٣ نيوكليتيده محفوظة لا يمكن أن تتشكل من تتابع هذه الفيروسات.

ثانياً: - النطاقات Domains :

المقصود بالنطاقات هو تقسيم جسم الفيروس المستقيم إلى عدة مناطق كل منطقة مميزة عن الأخرى فى تتابع نيوكليديتها وفى وظيفتها وفى صفاتها، ودراسة هذه النطاقات لها فوائد كثيرة من حيث التصنيف ومن حيث نشوء الفيروسات. من حيث التصنيف ذكرنا جزءاً منه سابقاً وسنكمل بعد ذلك. أما من حيث أهميتها فى نشوء الفيروس، فإن نموذج النطاق يؤدي إلى الاقتراح بأن نشوء الفيروسات يشمل إعادة ترتيب النطاقات بين الفيروسات المهاجمة لنفس الخلية. إنه من الصعوبة بمكان إيجاد دليل محدد لدعم هذا الاقتراح. إن الميكانيكية المحتملة لمثل إعادة الترتيب هذه يكون بعدم استمرارية النسخ حيث RNA polymerase ينسخ قالب فيروس واحد ينقلب لينسخ قالب ثانى يضمه بجانبه فى بعض النقاط الأكثر احتمالاً ليتحد بواسطته التركيب الثالث للفيروس. مثل هذا النموذج يدعم المضاعفة الجزئية التى تحدث فى نطاق T₂ للفيروس CCCvd وإعادة الترتيب للحمض RNA والذي يحدث لانتاج فيروس حيوانى من RNAs ناقص التداخل.

إن زيادة تفهمنا عن تتابع النطاقات فى الفيروسات يسمح بزيادة قربنا المنطقى إلى علاقة وظائف التركيب ضمن واحد أو أكثر من النطاقات.

نموذج النطاق لمجموعة PSTVd من الفيرويدات

The Domain Model For The PSTVd Group of Viroids

نتيجة فحص تماثل التتابع مع أكثر من ٤٠ تنوع تتابع، وهى توضع الآن تحت مجموعة PSTVd للفيرويدات. إن كلا من Keese & Symons سنة ١٩٨٥ قد وضحا بالتفصيل نموذج النطاق للفيرويدات والذي يكون أيضاً ملائماً للفيرويدات من تحت مجموعة B₂ و B₃ ويزود الأساس المبنى عليه تقسيم الثلاثة تحت قسم Subdivisions ضمن مجموعة PSTVd الكلية. وبالتالي فإن طراز النطاق مناسباً لجميع الفيرويدات لغاية الآن (المعروف تتابعها) باستثناء ASBVd.

عند دراسة المعلومات الموجودة فى جدول رقم ٨ فإنه من المهم أن نتذكر أن مقارنة التتابع فى PSTVd مع ٢٥ تابع عشوائى من حيث الحجم وتركيب القاعدة بنفس الطريقة يعطى تماثل تابع بنسبة $29.5 \pm 4.2\%$. وبالتالي فإن أى تماثل فى التتابع الكلى يصل لـ ٢٥ - ٣٥٪ بين فيريدين يمكن أن يؤخذ بعين الاعتبار ليدل على عدم العلاقة بينهما، فمثلاً بالنسبة لـ ASBVd بمقارنته مع جميع الفيرويدات الأخرى كما فى جدول ٨ يظهر عدم العلاقة بينه وبينها.

حتى بالنسبة للفيرويدات ضمن نفس تحت المجموعة Subgroup، فإن المقارنة يمكن أن تظهر إنخفاضاً فى تماثل التتابع الكلى. فى تحت مجموعة PSTVd هناك مقارنة ثمانية حالات فى حالة زوجية أظهرت التماثل والذي يتراوح ما بين ٤٢ - ٧٣٪. يجب أن نعرف أن تماثل التتابع الكلى يكون له قيمة محدودة فى تصنيف الفيرويدات ولا يعتمد عليه بشكل كامل، حيث أن كلا من Koltunow & Rezaian سنة ١٩٨٩ ذكرا بعض الانتقادات للذين يعتمدون اعتماداً كلياً فى التصنيف على تماثل التتابع الكلى بين الفيرويدات.

جدول A: مسائل التتابع بين أزواج من الفيريولات كما حدثت باستعمال طريقة Wilner & Lipson سنة ١٩٨٧.

[illegible]

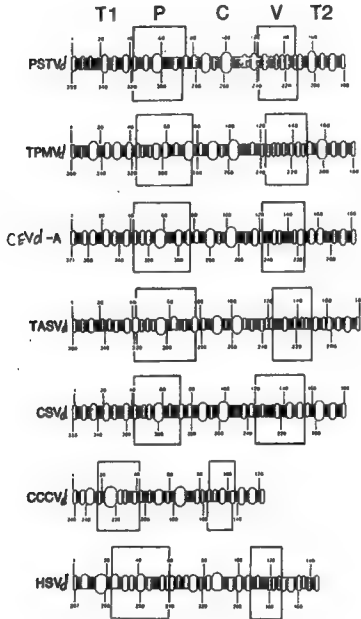
للقاسم التي استخدمت في هذا الجدول: $g=4, W=100, K=4$

نموذج النطاق لتحت مجموعة B_1 من PSTVd

The Domain Model For The PSTVd Subgroup B_1

إن مقارنة تحليل تتابع الحالة المزدوجة لأفراد من تحت مجموعة B_1 من PSTVd أظهرت وجود خمسة نطاقات (شكل ٧) وقد عرفت حدودها بواسطة ملاحظة تغييرات حادة في تماثل التتابع من المرتفع إلى المنخفض والعكس بالعكس. هناك مقارنات لحالات ازدواجية مختلفة كانت دائماً ثابتة في تحديد الموقع الدقيق (الصحيح) لحدود النطاقات. هناك شكل توضيحي يشرح هذه الحدود في سبعة فيرويدات في شكل ٨. وبالتالي فإن هذه النطاقات كانت قد اكتشفت بواسطة مقارنة تماثل التتابع بين قطاعات من كل جزئ للفيرويد مفضلاً ذلك على طريقة تماثل التتابع الكلى في جزئ الفيرويد.

هناك صفات أخرى لهذه النطاقات مكتوبة باختصار في جدول ٩، ١٠. بالرغم من التنوع في طول أفراد من فيرويدات تحت مجموعة PSTVd، إلا أن عدد النيوكليوتيدات في نطاق C ثابت بشكل واضح والاختلاف فقط في مواقع ٩٥ - ٩٧ في أفراد هذه المجموعة. بالنسبة لاصفر الفيرويدات فإن أكثر النقص في الحجم يحدث في النطاقين (V, T_1). إن تماثل التتابع بين النطاقات في مختلف الفيرويدات (جدول ١٠) ذو درجة عالية من الأهمية، بسبب الاختلافات الملحوظة والتي يمكن أن تحدث بين النطاقات المتجاورة. كانت مثل هذه المقارنة هي التي أدت إلى الاقتراح بأن الفيرويدات نشأت (تطورت) عن طريقة إعادة ترتيب النطاقات بين مختلف أفراد الفيرويدات المهاجمة لنفس الخلية وما يتبع ذلك من طفرات ضمن كل نطاق.



شكل رقم ٨ :
رسم يوضح التماثلات لسبعة فيروسات في تحت مجموعة PSTVd.

جدول ٩ : يبين حجم نطاقات الفيرود

اسم الفيرود	نطاق T_1	نطاق P	نطاق C	نطاق V	نطاق T_2	المجموع
PSTVd	٨٣	٦٣	٩٥	٥٤	٦٤	٣٥٩
TMPVd	٨٨	٦٣	٩٥	٥٢	٦٢	٣٦٠
TASVd	٨٢	٧٠	٩٧	٤٩	٦٢	٣٦٠
CEVd	٨٤	٦٩	٩٧	٥٧	٦٤	٣٧١
CSVd	٨٣	٦٠	٩٥	٦٦	٥٢	٣٥٦
CCCVd	٣٣	٤٩	٩٥	٢٨	٤١	٢٤٦
CTiVd	٣٢	٤٧	٩٥	٣٩	٤١	٢٥٤
HSVd	٤٥	٧١	٩٧	٣٧	٤٧	٢٩٧
ASSVd	٩٢	٥٦	٩٢	٢٩	٦١	٣٣٠
AGVd	١٠١	٥٠	١١٠	٣٦	٧٢	٣٦٩
GySVd	١١٣	٤٥	٩٧	٣١	٨١	٣٦٧
GVd 1B	١١٢	٥٠	٩٧	٢٩	٧٥	٣٦٣

ملاحظة :

إن الحدود بين نطاقي P, T_1 قد تغير قليلاً كما ذكر Keese & Symons سنة

١٩٨٥.

جدول ١٠: تماثل التتابع بين النطاقات في الفيرويدات المختلفة.

% تماثل التتابع في النطاقات						الفيرويدات المستعملة في المقارنة المزدوجة	
الكلية	T ₂	V	C	P	T ₁	2	1
٦٠	٤٨	٤٩	٧٢	٦٤	٧١	CEVd - A	PSTVd
٧٧	٩٤	٣٨	٩٨	٧٦	٧٠	TPMVd	
٦٩	٩٠	٤١	٧٢	٦٠	٧٢	TASVd	
٦٦	٨٣	٤٥	٧٩	٤٧	٧٨	CSVd	
٤٧	٣٥	٣٧	٧٥	٢٧	٢٦	CCCvd	
٤٣	٣٦	٢٨	٦٣	٣٦	٢٨	CTIVd	
٤٤	٢٩	٣٥	٤٤	٦٤	٣٤	HSVd	
٦٥	٤٨	٤٦	٧٢	٦٤	٧٤	TPMVd ←	CEVd - A
٧٧	٥١	٤٥	٩٩	٧٢	٩٣	TASVd	
٦٣	٣٨	٣٩	٨٤	٤٨	٧١	CSVd	
٤٤	٤٦	٣٥	٦١	٣٢	٣١	CCCvd	
٤٦	٣٨	٤٠	٦٧	٣٨	٣٨	CTIVd	
٤٧	٣٤	٣٢	٤٥	٦٧	٤٢	HSVd	
٧٣	٩٨	٢٨	٧٤	٥٧	٧٤	TASVd ←	TPMVd
٦٨	٨٨	٥٩	٧٤	٥٢	٦٩	CSVd	
٧٢	٨٩	٥٢	٨٢	٥٦	٧٢	CSVd ←	TASVd
٦٤	٥٩	٧٥	٦٦	٥٠	٦٨	CTIVd ←	CCCvd (246)
٤٤	٤٣	٣٤	٤٣	٤٥	٦٤	HSVd	
٤٠	٤١	٣٢	٤٧	٣٩	٦٠	HSVd ←	CTIVd

استعملت المقاييس 4، K=4، W=4، g=4

١ - نطاق C Domain = C :

هذا النطاق من أكثر النطاقات حفظاً Conserved، في المقارنة الازدواجية بين الفيرويدات فإن تماثل التتابع يختلف بين ٤٤٪ و ٩٩٪، هذه القيم تكون مساوية لـ أو أكثر من تماثل التتابع الكلى (جدول ١٠). إن المميزات الأساسية لهذا النطاق هو وجود إنتفاخ لولبي (حلزوني) على نحو تام يسمى U - bulged كما فى شكل ٧ وتتابع متكرر مقلوب (الاسهم فى شكل ٧) والتي معاً تتحدد ما يسمى بالمنطقة المركزية المحفوظة Central conserved region (CCR) ضمن مجال C. إن هذه المنطقة CCR هي التي تحدد تحت قسم subdivision لمجموعة PSTVd إلى ثلاثة تحت مجموعات.

٢ - نطاق P Domain = P :

تكون هذه المنطقة مترافقة مع التعبير بالأعراض المرضية، هذا ما قرره كثير من الباحثين. إن الميزة الأساسية لهذا النطاق هي قطعة من-Adenine dominated Oli-gopurine بحوالى ١٥ - ٢٠ نيوكليتيده على الشرط العلوى لجميع الفيرويدات باستثناء CCCVd حيث يوجد تتابع (As) Oligo. أما على قاعدة نطاق P فإن Oli-(U4-7) go غالباً ما تكون موجودة باستثناء مما هو فى CCCVd و CTiVd والتي تحتوى على قطعة غنية من (A) Oligo بسبعة نيوكليتيديات.

نطاق P فى فيروس CEVd يلعب دوراً فى المرضية :

إن العزلات التي تحدث طبيعياً فى الفيروس وتؤخذ من نبات مفرد، غالباً ما تحتوى أكثر من تنوع تتابع من الفيروس، وهذا التنوع يمكن أن يفصل ويحدد تتابعه عن طريق تحضير كلونات cDNA الكامل الطول من مخلوط فيروس. نظراً لأن كلونات cDNA للفيروسات ونسخها من RNA والتي هي معدية عندما تحقن على نباتات قابلة للإصابة يمكن أن تخضر، هذا يقدم فرصة فريدة لعلاقة تتابع ومن ثم تركيب ذو مرضية.

إن تحليل تتابع تنوعات كل من HSVd، CEVd، PSTVd، أظهر أن جميع إختلافات التتابع (تقريباً) لكل فيروس تقع ضمن نطاقى P و V. هذا يدل على أن التنوع فى شدة التعبير عن الأعراض المرضية فى تنوعات التتابع، يكون أكثر احتمالاً لأن يحدد عن طريق إختلاف التتابع فى واحد أو كلا هذين النطاقين. معظم المعلومات المتوفرة عن CEVd والنتائج تظهر أنه فى ١٧ من تنوعات التتابع، فإن جميع إختلافات التتابع تحدث ضمن نطاقى P و V فى مناطق تسمى PL و PR شكل ٩.

لتحديد أى من النطاقين P أو V كليهما كان مسؤولاً عن تغيير التعبير المرضى. حضرت إصابة تجريبية بكونونات cDNA والتي فيها احدى نصفى تنوع تتابع كان قد إرتبط خلال نطاق C مع النصف الثانى من تنوع ثانى (شكل ١٠). استعمل إثنان من تنوعات التتابع احدهما من الذين يحثون على إحداث أعراض شديدة على بادرات الطماطم والآخر من الذين يحثون على إحداث أعراض شديدة البساطة (معتدلة جداً). كانت تركيبات cDNA ملائمة حضرت باستعمال مناطق ال Bam HI و Hind III فى نطاق C. أظهرت النتائج الحيوية بوضوح أن نطاق P يحدد تعبيرات العرض المرضى، بينما نطاق V يمكن أن يكون له تأثير على مستوى الفيروس الذى يتكشف فى النباتات المصابة. ولقد تأكد أن تتابع الفيروسات الجديدة (الذرية) كانت دائماً نفسها كما فى تلك المكونة المستعملة فى الحقن.

نطاق V = V Domain :

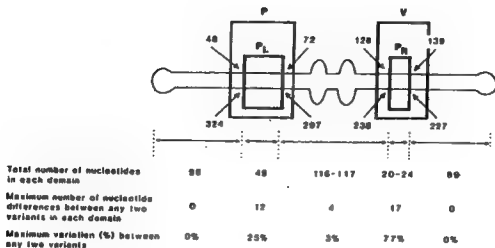
هذا النطاق يظهر الاختلافات الكبيرة فى التتابع بين الفيروسات قريبة الصلة. يظهر هذا النطاق أقل من ٦٠٪ تماثل فى التتابع بين أى زوج من الفيروسات باستثناء بين CCCVd و CTiVd (جدول ١٠) وهو أيضاً الأصغر حجماً يختلف من ٢٨ - ٦٦ نيوكليتيده (جدول ٩).

إن العلاقة الوحيدة المعنوية في التتابع في هذا النطاق بين فيروسات تحت المجموعة B₁. تكون منطقة Oligo - purine: Oligopyrimidine عادة في أقل الحالات ثلاثة أزواج قواعد G: C. في حالة الفيروس CEVd فإن نطاق V قد يكون له دوراً في تحديد المستوى من CEVd في نباتات العلامات المصابة. هناك أيضاً تنوع كبير في التتابع في هذا النطاق بين تنوعات التتابع للفيروس CEVd.

نطاقات T : T Domains

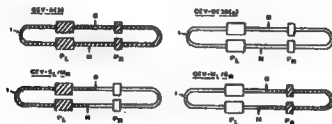
إن النطاقين الطرفيين لهما أهمية كبيرة وذلك بسبب الأدوار التي يمكن أن تقوم بها في تناسخ الفيروس وفي الكشف التطوري لجميع الفيروسات في مجموعة PSTVd. فمثلاً فإن هذه النطاقات يعتقد بأنها واقعة في جزئ ال RNA المتبادل بين إثنين أو أكثر من الفيروسات المهاجمة لنفس الخلية لتكون باعثة على فيروسات جديدة متوقعة. مع أن الأدوار الوظيفية لهذه النطاقات غير واضحة تماماً، إلا أن المحافظة العالية للتتابع في تنوعات نفس الفيروس يدل على الدور الهام في التضاعف (التناسخ). إن نطاق T₂ في الفيروس CCCVd يكون غير مألوف في ذلك الاختلاف في التتابع الجزئي الناشئ خلال كشف مرض كادانج - كادانج في نخيل جوز الهند.

إن نمائل التتابع في نطاقات T في تحت مجموعة B₁ للفيروس PSTVd يظهر تتابع محفوظ بشكل تام لـ C - U - C - C في نهاية العروة لنطاق T₁ ولتتابع مجموعات C - U - U - C في نطاق T₂ شكل V. هذه الحوافز تكون أيضاً موجودة في التتابعات الحديثة لكل من CLVd و HLVd. وعلى أية حال فإن هذه الحوافز لا تكون محفوظة في فيروسات ASSVd وتحت مجموعة B₂ أو فيروسات CbVd تحت مجموعة B₃ مع استثناء المواقع الصحيحة لـ C - U - C - C في النهاية اليسارية للنطاق T₁ في GVd 1B.



شكل رقم ٩ :

ملخص لتحليل النتائج لسبعة عشر تنوع تنبع من فيروسات اكسوكورز الحمضيات. يحدث معظم تغيرات النيوكليوتيدات في نطاقي P_L و P_R ضمن نطاق المرضية المادى P ونطاقات V المتغيرة.



شكل رقم ١٠ :

رسم توضيحي لأبوين من فيروسات اكسوكورز الحمضيات وفيروسين من وحى الخيال. الاب (2) CEVd - A يسبب أعراض شديدة على بادرات الطماطم، بينما الاب الثاني - CEVd DE 30 (a) يسبب أعراض معتدلة. P_L، P_R تتل على النطاقات المعروفة. B تتل على موقع Bam HI أما H فتتدل على موقع Hind III فى كلونات cDNA. هذه المعلومات استعملت فى بناء الفيروسين الآخرين.

النطاقات فى ال ASSVd تحت مجموعة B₂ من الفيرويدات:

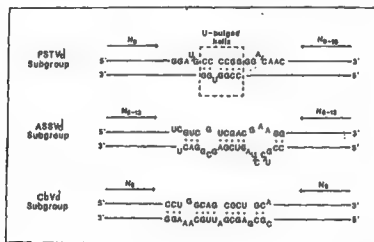
يمكن تقسيم كل فيرويد من الثمانية فيرويدات التابعة لتحت مجموعة ASSVd إلى خمسة نطاقات بواسطة المقارنة بالتتابع الزوجى بنفس الطريقة المتبعة فى تحت مجموعة PSTVd. إن الصفة الأساسية المشتركة بينهم هى وجود منطقة محفوظة مركزية ضمن نطاق C والتي تكون محدودة على قمة الشريط بواسطة تكرار طرفى، ولكنها هى التى تظهر نيوكليوتيدات مختلفة على ال CCR من فيرويدات تحت مجموعة PSTVd. أيضاً فى وسط نطاق T₁ فإن هناك مجموعة (تكتل) من ٢٠ نيوكليوتيدة محفوظة بشدة موجودة فى كلا الخيطين.

نطاق C فى مجموعة PSTVd من الفيرويدات:

ضمن نطاق C فى أفراد تحت مجموعة B₁ من فيرويدات PSTVd وتحت مجموعة B₂ فى فيرويدات ASSVd، فإن هناك منطقة مركزية محفوظة محددة جيداً تسمى Central conserved region (CCR) والتي لها مميزات عامة مشتركة بين التحت مجموعتين حتى برغم عدم وجود تتابع مشترك. كذلك فإن الصفات المشتركة تكون موجودة فى الفرد الوحيد من تحت مجموعة B₃ من فيرويد CbVd. وبناءً على هذه القواعد فإن جميع تنابعات الفيرويدات (لغاية سنة ١٩٩١) باستثناء ASBVd يمكن تصنيفها ضمن مجموعة PSTVd وتقسّم إلى ثلاثة تحت مجموعات. بالإضافة لذلك فإن علاقات ارتباط زيادة عن ذلك تكون موجودة بين أفراد من تحت مجموعة PSTVd و ASSVd قد تم إظهارها عن طريق وجود خمسة نطاقات متتابعة فى هذه الفيرويدات. يمكن التنبؤ بتركيب خمسة نطاقات مشابهة لتحت مجموعة CbVd كفرويدات جديدة مكتشفة تنابعاتها تحدد على تحت المجموعة هذه.

إن المميزات العامة لمنطقة CCR فى التحت ثلاثة مجموعات موضحة فى شكل ١١. إن حدود منطقة CCR تكون واضحة ومحددة بواسطة تتابع متكرر مقلوب

في قمة الشريط والتي يمكن أن تزود بساق دبوس الشعر والذي لا يكون دائماً ثنائي القاعدة تماماً. إن طول كل ساق يختلف من ٨ - ١٣ نيوكليتيده، مع أنه بشكل أكثر شيوعاً يكون بطول ٩ نيوكليتيدهات خاصة في تحت مجموعة PSTVd يكون طول الشريط العلوي عادة ٣٢ نيوكليتيده بالنسبة لتحت مجموعة PSTVd، إلا أنه يختلف من ٣٢ - ٤٢ نيوكليتيده لتحت مجموعة ASSVd، ويكون ٣٤ نيوكليتيده مقصوراً على أفراد تحت مجموعة CbVd. هناك نيوكليتيدهات مفردة أو استثنائية محفوظة على كلا الشريطين في منتصف كل من CCR وهذه واضحة في شكل ١١.

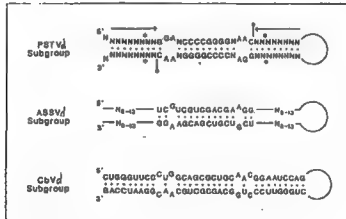


شكل رقم ١١:

المنطقة المحفوظة المركزية CCR لثلاثة من تحت مجموعة PSTVd تحدد هذه المنطقة بنهايات التتابع المتكرر للقلوب. ويظهر طول كل واحدة منها.

إن الانتفاخ اللولبي (الحلزوني) الذي على شكل حرف U يكون ذو أهمية خاصة في فيروسات تحت مجموعة PSTVd. إنه يظهر تركيب متجانس مع رايوسومال L 18 على منطقة الارتباط في 5S RNA في البكتيريا *E. coli* ومع المنطقة اللولبية المنتفخة المركزية المحفوظة على 5S RNAs للنباتات الراقية. ومن المحتمل أن بروتينات العائل المرتبطة لهذه المنطقة يمكن أن تلعب دوراً في تناسخ هذه المجموعة من الفيروسات.

إن التابع المتكرر المقلوب فى الشريط العلوى لمنطقة CCR لفيرويدات مجموعة PSTVd يسمح بتكوين تركيبات غالباً ثنائية الخيط ذات رأسين (تركيبها من الامام يشبهه من الخلف) فى أزواج Dimeric أو تكرارات أطول قليلة الأزواج Oligomeric من هذه الفيرويدات شكل ١٢. هناك اعتقاداً هاماً بأن هذه التركيبات يمكن أن تلعب دوراً فى بناء البوادم قليلة الأزواج الناجمة خلال تناسخ الدائرة الملتفة لمعطي خيط أحادى الأزواج و / أو جزيئات دائرية فى المعمل وبالتالي تجهز الخطوة الأخيرة فى عملية التناسخ. وعلى كل حال فإن الدليل يكون عادة غير مباشر فى التجارب العادية، بينما فى التجارب المعملية لم تزود بدليل واضح لنتيجة العمليات الخاصة. أحياناً فإن البيانات الواضحة للخيط العلوى فى منطقة CCR يبدو أنها داخلة فى سلسلة العمليات فى الظروف الطبيعية كانت قد زودت من دراسات الحيوية مستعملة نسخاً من CEVd محوية طفرات أحادية القاعدة فى الشريط العلوى فى منطقة الحلزون المنتفخ على شكل حرف U فى شكل ١١.



شكل رقم ١٢ :

تركيب متماكس الذى من الممكن أن يكون فى توافقات monomeric متكررة من أفراد كل تحت مجموعة من مجموعة PSTVd. جميع التتابعات مأخوذة من الخيط العلوى من CCR. موقع التكرار المتقلب فى الثلاثة تحت مجموعات يشار عليه بالأسهم. أما حرف N فهى نيوكليوتيدات غير محفوظة. فى فيروس HSVd فإن U مفروزة فى موقع معلم بالدائرة المظلمة فى تحت مجموعة PSTVd، علامة النجمة تدل لمواقع غرز لانتين غير مزدوجين من النيوكليوتيدات فى فيروس HLVD.

الدور المقترح في إعادة تنظيم النطاقات في نشوء الفيروسات

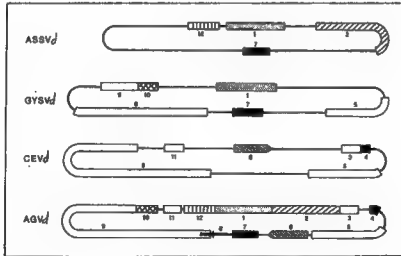
Proposed Role of Rearrangement of Domains In The Evolution of Viroids

إن نموذج النطاق بمجرد وصفه يؤدي إلى الاقتراح بأن نشوء الفيروسات يتضمن إعادة ترتيب النطاقات بين اثنين أو أكثر من الفيروسات والتي تهاجم نفس الخلية متبوعاً بواسطة طفرات أخرى. يكون دائماً هناك شيء من الصعوبة للتزويد بأدلة مباشرة لمثل هذه الاقتراحات، ولكن بسبب ظهور تنابعات لفيروس جديد فإن أدلة قوية غير مباشرة تكون واضحة وتؤكد الاقتراح. والمثل الجيد على ذلك هو التنابع الحديث لفيروس CLVd والذي فيه نطاقات T_1 و T_2 تظهر تماثل عال في التنابع لنفس النطاقات في PSTVd و TASVd بالترتيب، وتكون الحدود محددة جيداً بواسطة المقارنة بالطريقة الزوجية بين أعداد من تحت مجموعة PSTVd (شكل ١٠). إن وجود أطوال تحت نطاقية Sub - domain lengths في تنابعات TPMVd في نطاق P، وفي تنابعات PSTVd و HSVd في نطاق C يدل على أن إعادة ترتيب RNA يمكن أن تحدث ضمن النطاق بالإضافة إلى منطقة الحدود (شكل ١٠).

إن مقارنة تحليل التنابع لـ AGVd في تحت مجموعة ASSVd قد أظهر أيضاً خليط متزاخم من قطع والتي تبدو وكأنها مأخوذة من ASSVd، PSTVd، CEVd و GYSVd شكل ١٣. هذه القطع لها تماثل في التنابع والذي يختلف من ٥٢ - ١٠٠٪ من التنابع المتطابق في فيروسات الآباء المفترضة. لهذا فإن هذا الفيروس يمكن أن يكون مثلاً آخر والذي فيه يظهر إعادة الترتيب للحمض النووي RNA والتي يمكن أن تحدث ضمن النطاقات. إنه المثل الأول والذي يظهر فيه مثل إعادة الترتيب هذه والتي يجب أن تأخذ مجراها بين الفيروسات ضمن تحت مجموعتين من الفيروسات منفصلتين.

الدليل المباشر على إعادة الاتحاد في RNA بين ال RNAs الفيروية:

إن إعادة الاتحاد المفترض في RNA في النطاقات وتحت النطاقات بين الفيروسات مشتركة الإصابة (كما قد بينا) مبنياً على مقارنة تحليل التتابع. مع أن جميع الأدلة تكون مؤيدة لإعادة الاتحاد في RNA، إلا أنه لا يوجد بيانات تدل على الفترة الزمنية التي تلزم لمثل إعادة الاتحاد هذه لكي تحدث بين الفيروسات مشتركة الإصابة، كذلك لا يوجد أية محاولات ذكرت عن إنتاج فيروسات خيالية (وهمية) بواسطة الحقن المشترك لفيروسين بينهما علاقة على عائل نباتي مشترك. إن مثل هذه التجارب أصبحت الآن معقولة بواسطة استعمال سلسلة تفاعل ال Polymerase والاختيار الدقيق المحكم للبوادئ (سلسلة قصيرة من DNA) والتي يمكن أن تسمح بالتعرف على الجزيئات الناتجة المتوقعة. إن مثل هذا الاقتراح يمكن أن يكون أساسياً نظراً لأن أى من الذرية المتوقعة قد تكون ذات أضرار في التناسخ عندما تقارن مع الأبوين وبالتالي يمكن أن تتواجد فقد بتركيزات منخفضة.



شكل رقم ١٣:

علاقات التتابع بين فيروس AGVd وثلاثة فيروسات أخرى، القطع ذات تماثل التتابع العال بين فيروسين أو أكثر محفوظة في علب ومجموعة.

إن الأحماض النووية RNAs الفيروسية تكون وسيلة مزودة بأدلة أكثر ثباتاً عن إعادة الاتحاد في RNA. إن أكثر الأمثلة توضيحاً لذلك هو العمل الذي قام به Allison et al سنة ١٩٩٠ والذي اقترح بأن إعادة التكاثر لجينوم RNA الفعال بواسطة إعادة التكاثر بين نواحي الطفرات المقتضبة Deletion mutants. في هذا البحث فإن فيروس التبرقش الشاحب في اللوبيا Cowpea chlorotic mottle Virus (CCMV) كان يستعمل في هذه الدراسة نظراً لأنه يحتوي على جينوم ثلاثي في ثلاثة أحماض RNAs أحادية الشريط. إن الحقن المشترك لهؤلاء الثلاثة جميعاً يبدو أنه يكون مطلوباً لمقدرته (حيويته) على أوراق اللوبيا. إن الأحماض النووية الكبيرة من RNA₁ و RNA₂ تكون أحادية المسترونك monocistronic أما RNA₃ فإنه ثنائي المسترونك discistronic ويعمل شفرة لبروتينات 3a وللغلاف البروتيني. إن DNA المكون عن كل من هذه الأحماض الثلاثة حضرت بحيث زودت RNA transcripts لدراسة الحيوية. إن الالغاء الذي يتم ضمن أي من الجين 3a أو جين الغطاء البروتيني يبطئ حيوية الفيروس. وعلى أية حال فإن الحقن المشترك للأحماض RNA₁، RNA₂، كل منهما مع RNA₃ يبطئ الطفرات التي تؤدي إلى إنتاج ذراري فيروس تحتوي النوع الأصلي RNA₃ وهذا ثبت بطريقة تحليل التتابع. ونظراً لأن إعادة الاتحاد في RNA قد حدثت بين النماذج من طفرة RNA₃ ومستويات عالية من الفيروس قد حصل عليها في اليوم السابع أو بضع أيام بعد الحقن.

لقد ذكر العالم Robert H. Symons في مقالة المنشور في مجلة Molecular Plant - Microbe Interaction عدد ٤ صفحة ١١١ - ١٢١ الصادر في سنة ١٩٩١ تحت عنوان دورية التتابع في الفيروسات تدل على أن النشوء يتم بواسطة التضاعف كما يلي:-

Periodicity of Sequences in Viroids indicates Origin by duplication.

تبدى معظم الفيروسات تركيبات دورية (تركيب معين يتكرر بالترتيب) يتميز بتكرار وحدات من ١١ أو ١٢ نيوكليتيده في تحت مجموعة PSTVd، و ٦٠ نيوكليتيده في ASSVd و ٨٠ نيوكليتيده في ASBVd. مع أن التابع المتكرر وجد فقط في حوالي $\frac{1}{4}$ من مجموع التابع في أفراد تحت مجموعة PSTVd، فإن أطول المتكررات في ASSVd و ASBVd تشغل الطول الكامل في كل جزئ.

إن الدوريات في جدول ١١ يبدو أنها متخصصة في الفيروسات، نظراً لعدم وجودها في RNAs الصغيرة الأخرى أو الفيروسات. وعلى أية حال فإن الدورية الواضحة لم توجد في HSVd أو في تنوعات التابع الخاصة بها في فيروس الثمرة الباهتة في الخيار، ولا في أفراد كلتا تحت مجموعة PSTVd وهذا الشيء يبقى محيراً. ولقد اقترح بعض العلماء أن الدورية الملاحظة في الفيروسات يمكن أن تلعب دوراً في تفاعل RNA الفيروسي الشبيه بال DNA مع البروتينات نظراً لأن واحدة من صفات DNA هي المقدرة على ربط البروتين لتكون دورية تركيبية.

هناك احتمالية أخرى هي ذلك التركيب الدوري لمعظم الفيروسات يعكس أصلها التطوري حيث تضاعف التابع يكون متبوعاً بطفرة تسمح بزيادة في حجم وتكشف جزئيات الإصابة. المثل الممتاز لهذا التضاعف الجزئي لجزئ الفيروس يظهر خلال الإصابة لنخيل جوز الهند بواسطة فيروس CCCVd. إن الفيروس المتكون من ٢٤٦ نيوكليتيده تظهر مبكرة في الإصابة، لكن كلما تكشفت الأعراض تنشأ أشكالا ذات وزن جزئي أكبر جديدة، وفي آخر الأمر تسيطر على تجمعات الفيروس كلما تقدم المرض. يحدث تضاعف لجميع نطاق T_2 ويبدأ على ثلاثة مواقع منفصلة ضمن نطاق V ليعطي تناوبات زيادة من ٤١، ٥٠، ٥٥ أو 2×50 نيوكليتيده.

المضمون الوظيفي لتكشف هذه الأشكال الأعلى من CCCVd خلال تقدم المرض لم تعرف بعد. هنا بعض الفوائد تؤثر من التضاعف، فمثلاً زيادة التنافس لربط هذه التتابعات المتكررة لبعض مكونات العائل ضرورياً للتضاعف ولكن هذا يكون بصفة محدودة.

لقد ذكر أن التضاعف لنطاق T_2 من CCCVd يحدث بواسطة إنقطاع النسخ بأنزيم RNA polymerase ملتصقاً أو قافراً من قالب إلى آخر. هناك نموذجاً مماثلاً لتلك المقترح في فيروس الانفلونزا. فرضاً فإن تضاعف التتابع في الأفراد الأخرى من فيروسات مجموعة PSTVd يمكن أن تحدث بطريقة متماثلة للمرحلة الأخيرة لبناء جزئ كامل الطول.

جدول ١١: أمثلة على الدورية التركيبية في الفيروسات.

الاجماع	وحدات متكررة نيوكليوتيدة	الفيروس
CNGRRGRRAYCN نيوكليوتيدة ٦٩ - ١٧٢	١٢	PSTVd
CNGRRGRRAYCN نيوكليوتيدة من ٢٤٤ - ١٢٩	١٢	CCCVd
متكررة ٤,٥ - ٥,٥ مرة في ٣٣٠ نيوكليوتيدة	٦٠	ASSVd
متكررة ٣ مرات في ٢٤٧ نيوكليوتيدة	٨٠	ASBVd

ملاحظات:

N = a non conserved nucleotide A, C, G, or U, Y = Pyrimidine, R = Purine.

تتابع النطاقات فى الفيروسات والفيروسات يدل على النشوء بواسطة
أعاد ترتيب RNA .

Sequence Domain In Viroids and Virusoids indicate Evolution by RNA Rearrangement.

بمقارنة تحليل تتابع الأزواج لأفراد تحت مجموعة B₁ من PSTVd دلت على وجود خمسة نطاقات والتي تعينت حدودها عن طريق التغيرات الحادة فى تماثل التابع من العالى إلى المنخفض والعكس بالعكس. المقارنات الزوجية المختلفة كانت دائماً متناسقة مع الموقع الصحيح مع الحدود لكل نطاق. لقد تبين نموذج النطاقات باستعمال التابع فى الفيروس فقط من تحت مجموعة B₁ لمجموعة PSTVd. وعلى أية حال فإن فيروسات مرض ندب الجلد فى التفاح ASSVd تحت مجموعة B₂ لها نفس النطاقات كما يظهر بواسطة مقارنة الأزواج فى التابع.

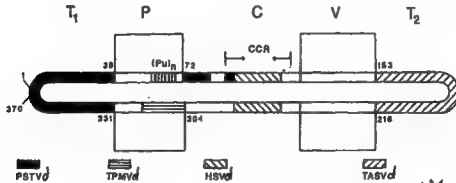
تقسم مجموعة PSTVd إلى تحت مجموعتين على أساس التابع فى المنطقة المركزية المحفوظة لنطاق C. ضمن نطاق C فى كل تحت مجموعة هناك تتابعات حوالى ٣٠ نيوكليوتيدة والتي هى محفوظة تماماً highly conserved بين كل الأفراد لكل تحت مجموعة ولكنها تختلف تماماً عن تلك الموجودة فى تحت المجموعات الأخرى. تتابعات المنطقة المركزية المحفوظة هذه تشكل ثلث نطاق C فى كل حالة. وعلى أية حال فإن الميزة العامة لكلا تحت المجموعتين هو وجود تتابع متكرر مقلوب قصير Short inverted repeat sequence ضمن النيوكليوتيدات المحفوظة والتي تظهر على شكل أسهم فى شكل ٧.

هذا النموذج للنطاق يؤدي إلى الافتراض بأن نشوء الفيروسات داخلياً فى إعادة الترتيب للنطاقات بين الفيروسات المهاجمة لنفس الخلية متبوعاً بنشوءات أخرى. إن الإثبات التجريبي لهذا الافتراض صعب تحقيقه ولكن التتابعات للفيروس الجديد والتي تستمر فى الظهور أعطت إثبات قوى غير مباشر. فمثلاً فى تتابع Columnnea latent viroid، فإن نطاقات نهاية اليد اليسرى T₁ ونهاية اليد اليمنى T₂ تظهر بتجانس

تتابع مرتفع لنفس النطاقات في PSTVd في فيروس تفرم قمة الطماطم مع حدود محددة جيداً ومتناسقة مع مقارنات الأزواج الأخرى شكل ١٤. إن وجود أطوال لتحت نطاق من تنابعات في فيروس النبات الذكر في الطماطم TPMVd في النطاق المرض P وفي HSVd، PSTVd في نطاق C شكل ١٤، يدل على إعادة الترتيب التي يمكن أن تحدث ضمن النطاق بالإضافة إلى الحدود. أيضاً كذلك فإن الفيروس المتسلق Scrambled وهو فيروس العنب الأسترالي AGVd من ASSVd تحت مجموعة B₂ الذي فيه تقريباً جميع ال ٣٧٠ نيوكليتيده يدور وأنها مأخوذة من أجزاء من فيروسات CEVd، PSTVd، ASSVd و GySVd. إن تشابه التتابع في أجزاء من AGVd يختلف من ٥٢ - ١٠٠٪ من التتابعات المتشابهة في الفيروسات الأباء المفترضة.

إن الميكانيكية التي يتم بها إعادة الترتيب للحمض RNA غير معروفة. إحدى الميكانيكيات المحتملة هي عدم استمرارية النسخ حيث أن RNA polymerase الذي ينسخ قالباً من فيروس واحد أو فيروسايد يتحول إلى نسخ قالب ثانوي متجاور على بعض المواقع والأكثر احتمالية تحديدها بواسطة التركيب الثالث tertiary للبالين.

من الأمثلة على إعادة الاتحاد بين الشريط الموجب لـ RNA للفيروسات هي التجمعات. في حالة فيروسات النبات فإنه في بعض الأحيان فإن المثال الأكثر تحديداً هو الذي ذكر بواسطة Allison et al سنة ١٩٩٠ عن فيروس التبرقش الشاحب الثلاثي في اللوبيا.



شكل رقم ١٤:

رسم توضيحي للفيروس CLVd يظهر القطع عالية تماثل يتابع مع فيروسات أخرى. CCR. منطقة مركبة عالية الحفظ.

ثالثاً:- إختلاف التتابع فى تنوعات التتابع فى الفيرويدات :

Sequence Variability in Sequence Variants of Viroids

مقدمة :

قبل أن ندخل فى هذا الموضوع يجب أن يكون لدينا فهماً واضحاً للاصطلاحات المستعملة والتي نذكر تعريفها فيما يلى :-

١ - عزلة الفيرويد A Viroid Isolation : هى مجموع جزيئات الفيرويد الكاملة الموجودة فى نبات مصاب واحد. إن مثل هذه العزلة يمكن أن تحتوى نوعاً واحداً أو أكثر من الفيرويد وتحتوى واحداً أو أكثر من تنوعات التتابع لكل أنواع الفيرويد.

٢ - أنواع الفيرويد A Viroid Species : تتكون أنواع الفيرويد من واحد أو أكثر من تنوعات التتابع مستقلة التناسخ والتي تظهر أكثر من ٩٠% من تماثل التتابع بواسطة المقارنة المزدوجة. جميع أفراد النوع الواحد تمتلك أقل من ٨٠% من تماثل التتابع مع أفراد من أنواع فيرويد آخر.

٣ - تنوع التتابع A Sequence Variant : هو جزئ فيرويد مفرد ذو تتابع محدد. وبالتالي فإن أنواع الفيرويد تحتوى واحداً أو أكثر من تنوع التتابع تحدث طبيعياً والذي كل منها يختلف بوحدة أو أكثر من النيوكليوتيدات عن تنوعات التتابع الأخرى ولكن كلها تظهر أكثر من ٩٠% من تجانس التتابع بواسطة المقارنة الزوجية.

٤ - النسبة المئوية لتماثل التتابع Percent Sequence homology : يستعمل هذا الاصطلاح للمقارنة بين فيريدين وهذا يحدد بواسطة طرق معتمدة على الكمبيوتر التي ذكرها Wilbur & Lipman سنة ١٩٨٣ وتستعمل فيها القياسات، K, W, g حيث أن $K = 4$ وهذا يستعمل للمقارنة فى الطول حيث المقارنة تساوى K أو أكثر.

W = 100 (Windo size) حجم الشق.

gap penalty $g = 4$.

فى هذه التعريفات نفترض وجود أنواع الفيرويد منفصلة عن بعضها تماماً وليست إختلافات مستمرة فى التابع فى الفيرويدات تحدث طبيعياً. مع أن هذا الأخير يعتبر غير محتمل فنحن نحتاج إلى وصف أنواع كثيرة من الفيرويدات وإلى عديد من تنوعات التابع فى كل نوع قبل أن نستطيع أن نكون واثقين عند التمييز الواضح بين أنواع الفيرويد.

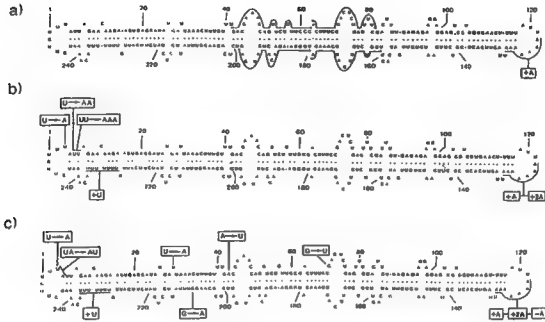
إن أكثر تنوعات التابع دراسة وتمييزاً فى صفاتها هى تلك التابعة لكل من HSVd و ASBVd و CEVd وإلى حد ما PSTVd و CCCVd وهناك توضيح كامل ومطول عن تنوعات التابع المذكورة فى كتاب Keese et al سنة ١٩٨٨.

I - تنوعات التابع فى ASBVd :

Sequence Variants of ASBVd

كان أول تحليل واضح لتنوعات التابع فى ASBVd قام به Rakowski & Symons سنة ١٩٨٩. لقد حددا تنابعات ١٦ نوع من ٢٤٧ نيوكليتيده ذات علاقة مع ASBVd مثل تنوع 1 - SB والتي كانت قد عزلت من أوراق ثلاثة أشجار أفوكادو فى مناطق منعزلة فى استراليا. كانت معظم النيوكليتيديات المختلفة موجودة فى اليد اليمنى واليسرى للعروات فى جزئ ASBVd بينما العدد الباقى يختلف من ٢٤٦ إلى ٢٥١ نيوكليتيده.

يظهر فى شكل ١٥ مواقع هذه التغيرات



شكل رقم ١٥ :

الاختلافات في تنوعات التتابع المأخوذة من ثلاثة عزلات (a)، (b) و (c) من فيروس ASBVd. النيوكليوتيدة المتغيرة موضوعة في علبه وهي ذات علاقة بالتتابع ويقترح التركيب الثانوي في تنوعات التتابع SB - 1 من الفيروس ASBVd الموجودة في عزلة (a). في عزلة a فإن الأربعة مواقع من الطبقة الأولى في مركز الجزيء الذي كان يستعمل لتوالد كلونات cDNA للتتابع تكون مغلطة بخط.

II - تنوعات التتابع في مجموعة PSTVd :

Sequence Variants of PSTVd Group of Viroids

١ : تنوعات التتابع في CEVd

لقد أجرى معظم هذا البحث على خمسة عزلات استرالية مستخلصة من حمضيات ثم بعد ذلك تكاثرت في الأقحوان والطماطم، وكان من المثير للاهتمام أنه على بادرات الطماطم فقد أعطت هذه العزلات الخمسة نوعين من الأعراض

فقط ١ - معتدلة أو صعبة الظهور. ٢ - شديدة حيث ظهر تدلى للأوراق شديد مع أوراق متجمدة وتقرزم. كانت هذه العزلات كما يلي:-

١ - العزلات المسببة لأعراض شديدة هي CEVd - A ، CEVd - DE 25 ، CEVd - J .

٢ - العزلات المسببة لأعراض معتدلة CEVd - DE 26 ، CEVd - DE 30 .

إن مقارنة التنوعات المتتابعة مع كل عزلة يتطلب تحضير الطول الكامل لكلونات cDNA والتحديد الكامل لتتابعها. فقط في هذه الطريقة يمكن لاختلاف التتابع ضمن تنوعات التتابع بالإضافة إلى تقدير عدد تنوعات التتابع في كل عزلة يمكن تحديده. وعلى أية حال فإنه من المهم أن ندرك أن التتابع في عدد كبير من كلونات cDNA يكون مطلوباً لاكتشاف عدد قليل من تنوعات التتابع. مثلاً إذا كان فرد معين من تنوع متتابع موجوداً بمستوى ١.٥٪ من مجموع التنوعات عندئذ على الأقل يجب أن يكون هناك ٢٠ كلونة من cDNA معروفة التتابع لتزويدنا باحتمالية معقولة لاكتشاف هذا الفرد. زيادة على ذلك فإن الكمية النسبية لكل تنوع تتابع في أى عزلة يكون محتمل جداً لأن يتغير معتمداً على ظروف النمو وبشكل خاص أكثر على العائل النباتي المستعمل. وبالتالي فإن أعداد تنوعات التتابع في أى عزلة واحدة حددت بواسطة تنابعات كلونات cDNA بالتأكيد سوف يكون تقديراً غير سليم.

وبالنسبة للعزلات السابقة فإن عزلة CEVd - A تحتوي على الأقل إثنين من تنوعات التتابع والتي تختلف بواسطة قليل من النيوكليوتيدات، بينما CEVd - DE 25 وعزلة CEVd - DE 26 يبدو أنها تحتوي على تنوع متتابع واحد فقط. أما تنوعات التتابع في عزلة CEVd - A وعزلة CEVd - DE 25 فإنها كانت متشابهة جداً مع التنوع المتتابع المسمى Californian والتي تحددت بواسطة Gross et al سنة ١٩٨٢. أما التنوع المتتابع في CEVd - DE 26 فإنه يحوى ٢٧ نيوكليوتيدة تختلف نسبياً مع التنوع المتتابع في CEVd - A. أما في عزلة CEVd - J يظهر أكبر إختلاط

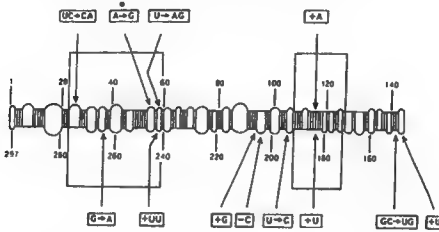
من تنوعات التتابع، فقد وجد أنه من تتابع حوالى ٢٠ كلونة من cDNA فقد وجد تسعة تنوعات متتابعة مختلفة. وهناك تجارب أخرى تدل نتائجها على وجود عدد كبير من تنوعات التتابع أكثر من تسعة فى حقل واحد مزروع بأشجار البرتقال المطعمة على أصول *Poncirus trifoliata* والتي تظهر عليها الأعراض الكلاسيكية لمرض اكسوكورتز الحمضيات، مثل انفصال القلف عن جذع الأصل. بعد ذلك فإن أشجار الحقل يمكن أن تختلف بشكل كبير فى عدد التنوعات المتتابعة لـ CEVd الموجودة فيها.

إن اختلافات التتابع الموجودة فى ١٥ تنوع من CEVd الأسترالى بالإضافة إلى اثنين من تنوعات التتابع فى كاليفورنيا كانت واقعة بشكل أكثر وضوحاً فى نطاقى P و V (شكل ٩)، وبشكل أساسى فإن جميع التنوعات المتتابعة تكون زيادة على ذلك منحصرة فى مناطق أصغر والتي نطلق عليها P_L و P_R . إن منطقة P_R تتكون من ٢٠ - ٢٤ نيوكليتيده من المجموع الكلى ٣٧٠ - ٣٧٥ نيوكليتيده (٦٪ من جزيء CEVd) يكون قابل للتغير جداً مع كثير من تغير النيوكليتيديات، بينما منطقة P_L تتكون من ٤٩ نيوكليتيده تحتوى قليل من التغيرات.

٢ - تنوعات التتابع فى HSVd :

إن فيرويد الشجرة الباهتة فى الخيار CPFVd وفيرويد تقزم حشيشة الدينار HSVd تعتبر أصلاً كأنواع فيرويد منفصلة عندما حددت التتابعات النيوكليتيده فيها لأول مرة فوجد أن طول الأول ٣٠٣ وطول الثانى ٢٩٧. وعلى أية حال فإنهما تنوعات تابع حقيقية لنفس الفيرويد بسبب أنها تمتلك أكثر من ٩٠٪ تتابع متماثل وعن طريق الاستعمال الشائع فقط يعتبر الفيرويد HSVd هو الاسم المستعمل للفيرويد وكأنه فيرويد منفصل. تنوعات التتابع بين التنوعات الأصلية لـ HSVd و CPFVd مذكورة فى شكل ١٦، وهى تقع غالباً فى نطاقى P و V. وفى دراسات حديثة فإن Shikata سنة ١٩٩٠ لخص التوزيع والعلاقة بين تنوعات التتابع لـ HSVd المعزولة من مدى واسع لأنواع أشجار الفاكهة، وبالنسبة لعزلة حشيشة الدينار من HSVd،

فإن هناك سبعة تنوعات تتابع أخرى تختلف في الطول من ٢٩٧ - ٣٠٣ نيوكليوتيدة تصل إلى ١٣ متبادل، منها سبعة insertions داخلات وثلاثة deletions مشطوبات. وبالتالي فإن HSVd يكون مماثل لـ CEVd في إظهار مجال من تنوعات التتابع في العزلات الحقلية للفيروس ومع معظم الاختلافات الحادثة في نطاقى P و V.



شكل رقم ١٦:

رسم توضيحي للنيوكليوتيدات الواجب تغييرها لقلب HSVd ليصبح CPFVd وإن مناطق النطاقات لكل من P و V معبر عنها بشكل مستطيلات.

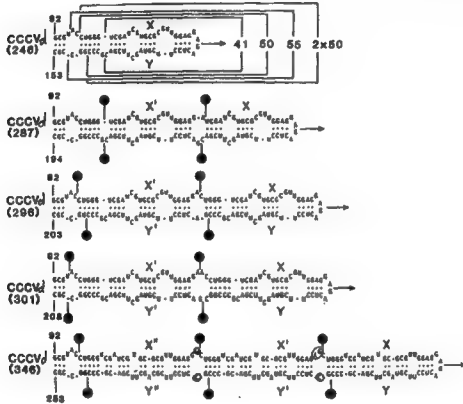
٣ - تنوعات التتابع في فيروسات أخرى:

Sequence Variants of Other Viroids

لقد ذكر أن هناك إختلافاً في النيوكليوتيدات في تنوعات تتابع كانت قد وصفت في PSTVd وبشكل أقل ذكرت في CSVd. وكما قد ذكر سابقاً في حالة CEVd و HSVd فإن معظم التغيرات تحدث في نطاقى P و V.

أما فيروسد CCCVd فإنه يتميز عن جميع الفيروسات الأخرى في كونه نوع غير عادي من تنوع التتابع ينشأ منه مثل مرض كادانج - كادانج ويتقدم في نخيل جوز الهند المصاب. إن التتابع في عزلات CCCVd المأخوذة من نخيل محدد ومن أوراق ذات أعمار مختلفة ضمن نخلة مفردة أظهرت ثلاثة أنواع من تنوعات التتابع

بالإضافة إلى ٢٤٦ نيوكلييتيد قوهى القواعد الأساسية للأنواع. هذه تشمل C in section فى موقع ١٩٨ من نطاق C ومضاعفات نطاق T₂ بالإضافة إلى جزء من نطاق V من ٤١، ٥٠، ٥٥ أو ١٠٠ (٢ × ٥٠) نيوكلييتيد شكل ١٧ وطفرات فى القواعد المجاورة للحدود لبعض التضاعف الجزئى. يبدو أنه لا يوجد هناك إختلافاً فى نطاقى P و V فى تسعة عزلات منفصلة من CCCVd مأخوذة من مناطق مختلفة فى القلبين والتي أيضاً تتعارض مع المواقع فى الفيرويدات الأخرى.



شکل رقم ١٧ :

تضاعف التتابع فى نطاقى V و T₂ للفيرويد CCCVd. إن طولى التتابع X و Y إما ٤١، ٥٠ أو ٥٥ نيوكلييتيد، تكون مضاعفة أما مرة واحدة فى CCCVd (٢٨٧)، CCCVd (٢٩٦) و CCCVd (٣٠١)، أو مرتين فى CCCVd (٣٤٦). تدل الأسهم فى الجهة اليمنى على روابط فى تتابعات X و Y بينما الدوائر المظلمة تدل على روابط التتابع للمضاعف. الحروف الخاطئة بدلالة تدل على إختلاف تتابع فى تنوع التتابع.

رابعاً : تشخيص الفيروسات : Diagnosis of Viroids

مقدمة :

هناك متطلبات ضرورية لتحسين وتطوير الإجراءات لسرعة وتخصص اكتشاف الفيروسات ذات الأهمية الزراعية ويجب أن تكون هذه الإجراءات جاهزة للاستعمال في مثل تلك المعامل كما في أقسام كليات الزراعة وشركات البذور بالإضافة إلى مراكز الأبحاث. في حالة بعض المحاصيل، مثل البطاطس وفي تحليل عينات البذور فإن هذه الإجراءات يجب أن تسمح بإجراء الاختبار يومياً لكميات كبيرة من العينات. زيادة على ذلك فإن حساسية الطريقة يجب أن تكون عالية بشكل يكفي لاكتشاف موثوق به للمستويات المنخفضة لمسببات المرض الفيروسي بالإضافة إلى أى تنوعات تتابع يمكن أن تحدث في الحقل.

هناك عدة طرق استعملت وتستعمل في الكشف عن وتشخيص الفيروسات نذكر هذه الطرق للاستفادة.

١ - الاختبارات الحيوية Bioassays :

على نحو تقليدي فإن إجراءات التشخيص لمسببات الأمراض النباتية (الفيروسات والفيروسات النباتية) هي إجراءات حيوية وتعتبر سهلة بشكل عام وتعتبر حساسة عند مقارنتها مع بعض الطرق الأخرى. منذ اكتشاف الفيروسات سنة ١٩٧١ أجريت أبحاثاً كثيرة لإيجاد العوائل الطبيعية للفيروسات والتي تسمى العوائل المفرقة Differential hosts والتي تعطى أعراضاً جيدة. فمثلاً فيروس التمر الباهتة في الخيار CPFDVd يعطى أعراضاً مميزة في الخيار لذلك ليس هناك حاجة للبحث عن عوائل معرفة أخرى. ولكن لسوء الحظ فإن معظم الفيروسات الأخرى تظهر أعراضاً ضعيفة غير مميزة في عوائلها الطبيعية الأخرى أو تسبب أعراضاً يمكن بسهولة أن تختلط مع أعراض مسببات أخرى. فمثلاً نقرم الاقحوان المتسبب عن CSVd تختلف أعراضه كثيراً باختلاف أنواع الاقحوان التي يصيبها وكثيراً ما

يكون من الصعب توفر قاعدة تعريف تعتمد على الأعراض فى العوائل الطبيعية فقط. إلا أن الصنف المزروع Mistletoe تظهر عليه الأعراض على شكل بقع عديدة على الأوراق مميزة وبالتالي يمكن استعماله فى الفهرسة. فمثلاً تؤخذ قمم نبات ال Mistletoe وتطعم على النباتات المراد إختبارها، بعد حوالى سبعة أسابيع يمكن قراءة النتائج. إلا أن هناك عيوباً لهذه الطريقة.

أما بالنسبة لفيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس PSTVd فإن الكاشف المناسب له مهم جداً بسبب أن الأعراض على البطاطس من الصعب التعرف عليها، زيادة على ذلك فإن الإصابة فى السنة الأولى عادة ما تبقى بدون أعراض، هذا يعنى أنه من المستحيل استبعاد الفيرويد من الأصول المستعملة للسنة القادمة. مع أن الفهرسة بالحقن فى نباتات الطماطم النوع Rutgers قد سبب تقدماً كبيراً فى التشخيص وأن نسبة كبيرة قد حلت، إلا أنه ليس كل الإصابات يمكن أن تظهر وتوجد ويحل بهذه الطريقة.

أجريت أبحاثاً كثيرة لزيادة تعبيرات الأعراض فى الإصابة الفيريودية على نباتات الاختبار. وجد أن ظروف النمو مهمة جداً، درجات الحرارة المرتفعة والكثافة الضوئية وطول فترة الإضاءة بشكل عام تخفض مدة الكمون وتلازم ظهور تعبيرات الأعراض. ولكن لا يوجد قانون عام فى هذا الموضوع كما ذكر Diener سنة ١٩٧٩.

هناك قليل من العوائل التى تعطى بقعاً موضعية Local lesions عند الإصابة الفيريودية (حيث أن هذه العوائل هامة فى التشخيص)، فمثلاً فيرويد CSVd يسبب بقعاً موضعية على أوراق نبات *Senecio cruentus* بعد ١٢ - ١٨ يوم من الحقن. وكذلك وجد أن فيرويد PSTVd يسبب بقعاً موضعية على نبات *Scopolia sinensis*.

إن التشخيص بالطرق الحيوية هى إجراءات حيوية فى الطبيعة شاملة الحقن بالعصارة أو بالتطعيم لنباتات كاشفة. هذه الإختبارات التى يبدو بأنها حساسة ودالة

على طبيعة العدوى للعامل المسبب، قد ثبت بأنها غير فعالة إلى حد ما. إن التعبير العرضي (بالأعراض المرضية) لبعض المسببات الخاصة يكون معتمداً على الجينوتايب Genotype وال phenotype وبالتالي فإن تلك الدراسات لهذه الظاهرة تصبح مؤكدة معملياً وكثيراً ما تتطلب أصناف نباتات كاشفة وفترة حضانة طويلة.

في حالة كثير من الفيروسات فإن تكشف الأعراض عادة ما يأخذ وقتاً طويلاً عنه في حالة الفيروسات. فمثلاً تكشف أعراض فيروس ASBVd يحتاج من ستة شهور إلى أكثر من سنتين بعد حقن بادرات الأفوكادو القابلة للإصابة، وظهور الأعراض ليس مؤكداً ١٠٠٪. وبالتالي فإن هذا الإجراء الحيوي للتشخيص يكون عملياً فقط مع الفيروسات مثل PSTVd والتي تظهر أعراضاً خلال ٢ - ٤ أسابيع على بادرات الطماطم. حتى في هذا الإجراء يمكن أن تظهر بعض الصعوبات، فمثلاً بعض سلالات الفيروس تعطي أعراضاً بسيطة جداً على نباتات الطماطم، وإن مثل هذه النباتات المصابة من الصعب تمييزها عن نباتات الكنتروال السليمة. زيادة على ذلك فإنه نظراً لأن الفيروسات المختلفة يمكن أن تعطي بشكل أساسي نفس الأعراض على بادرات الطماطم، لذا فإن إختبارات أخرى تكون ضرورية لتحريف الفيروس الحقيقي المسبب لإحداث الإصابة.

كثيراً من المشاكل المذكورة سابقاً والتي ترافق الإختبارات الحيوية للكائنات الممرضة الفيروسية أمكن التغلب عليها باستعمال الإختبارات البنية على السيروولوجي. إن أكثر هذه الإختبارات شيوعاً هو إختبار ELISA الذي هو Enzyme linked immunosorbent assay الذي استعمله Clark سنة ١٩٨٤ و Cooper سنة ١٩٨٦. يعتمد هذا الإختبار على التعرف على أو تمييز الغطاء البروتيني بواسطة الأجسام المضادة Antibodies، لقد ثبت أن هذا الإختبار موثوق به ومتعدد الاستعمالات. وعلى كل حال فإن إختبار ELISA لا يتلائم مع الفيروسات نظراً لأن هذه العوامل المرضية (الفيروسات) هي أحماض نووية RNAs غير مغلفة فهي تفتقر إلى الغطاء البروتيني وبالتالي لا يمكن اكتشافها بالطرق السيروولوجية.

٢ - الهجرة الكهربائية فى بولى اكريلاميدجيل :

Polyacrylamide Gel Electrophoresis

إن أول إختبار بيوكيميائى - بيوفيزيائى للفيرويدات كان طريقة الهجرة الكهربائية فى البولى اكريلاميد جيل (PAGE). هذه الطريقة اكتشفت بواسطة Morris & Wright سنة ١٩٧٥. وهى تعتمد على استخلاص الأحماض النووية من النسيج المصاب يتبع ذلك التحليل بواسطة Electrophoretic على ٥% polyacrylamide gel. هذه الطريقة أجري عليها تحسينات وتتبع مع كثير من الفيرويدات.

تحتاج هذه الطريقة إلى يومين لكى تكتمل أما الإختبارات الحيوية مثلاً لفيرويد CSVd يحتاج ٤٩ - ٥٦ يوم. زيادة على ذلك فإن السلالات المعتدلة يمكن اكتشافها بسهولة كما هو الحال فى السلالات الشديدة. إن المأخذ الوحيد على هذه الطريقة هو عدد العينات التى يمكن أن تستعمل فى يوم واحد وهى محدودة فى ٢٠ - ٤٠ عينة. إلا أن هناك تحسينات أدخلت على هذه الطريقة بحيث يمكن استعمال ١٠٠ - ٢٥٠ عينة ويمكن اكثار الفيرويد فى نباتات الطماطم كخطوة وسيطة. هذه الخطوة الوسيطة حلت مشكلة كبيرة فى هذه الطريقة وهى مشكلة النسبة المنخفضة جداً من الفيرويد فى العينة النباتية.

هناك بعض الملاحظات على هذه الطريقة وهى أن سلوك الحزمة فى الجيل يختلف كثيراً مع النباتات مثل الأقحوان أو أنواع البطاطس المستعملة، وبالتالي فإن قراءة النتائج غالباً ما تكون صعبة جداً. لكن بالنسبة للفيرويد PSTVd فإن هذه المشكلة قد وجد لها حلاً عن طريق استعمال الطماطم كمائل وسيط. عندئذ فإن سلوك الحزمة لـ RNA المستخلص من نباتات الطماطم يكون جيداً، وهناك فائدة أخرى لاستعمال نباتات الطماطم وهى أن الفيرويد يتكاثر فى العائل الوسيط. وقد أجرى تحسين على هذه الطريقة وذلك باستبدال خطوة ال Dialysis

بخطوة Desalting باستعمال مرشح Sephadex. إن استعمال طريقة Tomato PAGE لها ثلاثة مآخذ رئيسية هي:-

١ - تحتاج حوالى ستة أسابيع لاكمالها.

٢ - تحتاج إلى جهد كبير.

٣ - تحتاج إلى تكاليف مادية كبيرة.

أما بالنسبة لاستعمال هذه الطريقة مع فيروسات الخيار فمن الصعب وجود عائل وسيط لها.

٣ - الهجرة الكهربائية ثنائية الاتجاه:

Bi - Directional Electrophoresis

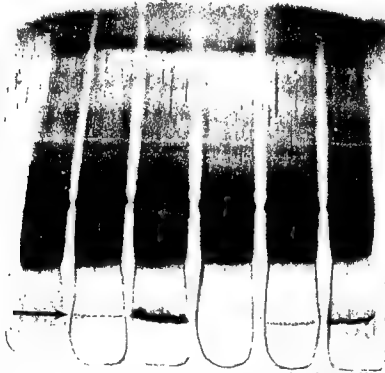
إن طريقة الصبغ بمادة Toluidin blue تستعمل عادة فى طريقة - Tomato PAGE وهى ليست شديدة الحساسية. إن استعمال طريقة صبغ أكثر حساسية يمكن أن تزيد كثيراً إمكانية اكتشاف الفيروسات. وعلى أية حال إذا كانت الحزم فى الجيل الطبقى يمكن أن تصبغ بنبضات الفضة، فإن المنطقة بأجمعها التى فيها حزمة الفيروس تعين ويكون لونها مسود بسبب وجود مستوى مرتفع نسبياً من الاضطرابات فى تلك المنطقة.

عند قطع حزمة الفيروس بعيداً عن الجيل الفاصل ثم وضعها عند قاعدة جيل آخر، فإن موقع حزمة الفيروس يمكن أن يتحدد بسهولة إذا أضيف Xylene cya-nol FF فى المنظم الحامل الأساسى ولكى يهاجر ال Xylene - cyanol FF أسرع إلى حد ما من الفيروس. الجيل الثانى هو جيل مدنتر يحتوى ٧ مول يوريا ويسيل على حرارة ٦٥°م.

كما هو معروف فإن الفيروسات هى جزيئات ذات تركيب دائرى، تحت ظروف الدنترة فإن الجزيء يفقد تركيبه المعقد وعند الهجرة الكهربائية فإن الجزيئات

الدائرية سوف تتحرك ببطء أكثر من الأفراد الملتوية (غير الدائرية). أما الجزيئات الأخرى الموجودة في منطقة الفيرويد والتركيب المستقيم سوف لا تتأثر في حركتها النسبية بواسطة التغير في ظروف ال Electro phoretic. نتائج هذه الطريقة واضحة في شكل ١٨. كل الجزيئات المسببة للاضطرابات حول حزمة الفيرويد في الجيل الأول تتحرك بسرعة أكثر نسبياً، بينما جزيئات الفيرويد التي تتحرك ببطء تكون موجودة بالقرب من موقع الإبتداء في منطقة تكون خالية كلية من أى أحماض نووية أخرى والتي تسمح بالاستعمال لنظام الصبغ الحساس مثل نترات الفضة.

ولكى نثبت أن هذه المنطقة (الحزمة) هي فعلاً حزمة للفيرويد المطلوب، تقطع هذه الحزمة بعيداً عن الجيل ويستخلص الحمض النووي من الحزمة ويحقن في نباتات كاشف (مثلاً الطماطم لفيرويد PSTVd) عندها تتكشف أعراض نموذجية لتلك الفيرويد.



شكل رقم ١٨ :

إختبار الهجرة الكهربائية ثنائية الاتجاه للفيرويد PSTVd. في الجزء السفلى في الجيل - الفيرويد - ملاحظ في مستخلص النباتات المريضة ويشار إليه بالسهم.

تحضير العينات:

يؤخذ ١ غرام من الأوراق وتسحق في ضاغط بينما يضاف ٠,٤ مول منظم الذى تركيبه بالماء يحتوى ١,٧٠ من 8-hydroxyquinoline - تضاف إلى عجلات فينول مشبع بالماء يحتوى ١,٧٠ من 8-hydroxyquinoline - تضاف إلى عجلات الضغط، يضرب المخلوط ليتجانس لمدة ١,٥ دقيقة باستعمال Whirlmix. يوضع فى آلة الطرد عن المركز، بعد ذلك يؤخذ ٤٠٠ ميكولتر من العائم وترسب الأحماض النووية التى فيه بالايثانول. يعاد تعليق الكريات الصغيرة فى ٥٠ ميكولتر ماء وبعد إضافة ١٠ ميكولتر محلول مائى محتوياً ٢٤٠ سكرز، ٢٥,٧٠ من Xylene - Cyanol FF و ١,٧٠ بروموفينول أزرق، يوضع المخلوط كله فوق الجيل.

يمكن تبسيط الإجراءات كالآتى:-

تستمر الهجرة الكهربائية تحت الظروف الطبيعية حتى يصبح The Xylene - Cyanol FF فى قاع الجيل، بعد ذلك تمكس قوة القطبية ونفس الجيل يهاجر كهربائياً على حرارة ٧٥م. فى هذه الحالة يمكن استعمال منظم واحد 20 mM tris 19 mM PO3 H3, pH 8.3 EDTA 0.06 mM. هذا الإجراء يحتاج قليل من التعديل فى الصبغ بالفضة: يجرى غسيل وثبيت لمدة ١٥ ثانية بدلاً من ٢ × ١٠ ثانية، يكون الصبغ بـ ٠,٩٥٪ ترات فضة بدلاً من ١,١٩٪ ترات فضة. السائل المتكون يخفف بنسبة ١:١ بماء، هذا يحتاج لوقت من ١ - ٤٠ دقيقة. ويمكن ملاحظة ما يلى:-

١ - إن هذه الطريقة سريعة حيث أن الإجراء كله ابتداءً من قطف الأوراق حتى قراءة النتائج يكون فى حوالى ٨ ساعات.

٢ - الطريقة حساسة جداً حيث يمكن اكتشاف ٥ نانوغرام من الفيروس / أثر فى الجيل. وبإجراء حسابات بالكمبيوتر يمكن أن نكتشف ١٠ نانوغرام فيروس لكل غرام من الأوراق، وبهذه الحالة فإن هذه الطريقة تكون حساسة كما فى حالة طريقة التهجين الجزيئى (جدول ١٢).

٣ - هذه الطريقة أكثر أماناً حيث أنها مبنية على معيارين يصبح الفيرويد واضحاً عن طريق الصبغ وإن الصبغ يكون في مكان منخفض في الجيل وبالتالي فإن الفرصة الخاطئة بواسطة false positives (الكولونات الخاطئة) تكون منخفضة.

٤ - لا تتطلب كيمائيات خطيرة مثل الفسفور المشع.

جدول ١٢: مقارنة بين طريقة الهجرة الكهربائية ثنائية الاتجاه BDE وطريقة التهجين الجزيئي لـ cDNA في مقدرتها على اكتشاف فيروس PSTVd.

حجم العينة	الكمية المكتشفة		الطريقة
	مطلقة / تركيز / غرام من الأوراق		
٦٠ ميكولتر (٠,٥ غرام من الأوراق)	١٠ نانوغرام	٥ نانوغرام	BDE
٣ ميكولتر (٠,٠٠٦ غرام من الأوراق)	٢٠ - ٤٠ نانوغرام	١٢٥ - ٢٥٠ بيكوغرام	cDNA

وإذا وضعنا في الاعتبار المعلومات الآتية:

١ - تركيز الفيرويد PSTVd ١٥٠٠ - ١٩٠٠ نانوغرام / غرام أوراق.

٢ - تركيز الفيرويد PSTVd ١٢٦٠ نانوغرام / غرام من القمة النامية في النبات.

٣ - تركيز الفيرويد CSVd ١٢٠٠ نانوغرام / غرام أوراق.

يتبين لنا أن كلا الطريقتين تلحم متطلبات اكتشاف PSTVd و CSVd في النباتات المريضة. كذلك فإن المعلومات تدل على أن العينات يمكن أن تختبر بنجاح. في تجربة مع PSTVd وجد أن تحضير العينة كما سبق ذكره، بها نستطيع اكتشاف عينة مريضة واحدة مع ٤٩٩ عينة سليمة وأن حذف الترسيب بالإيثانول

واستعمال طور مائي مباشرة للهجرة الكهربائية، عندها يمكن إكتشاف عينة مريضة واحدة من بين ١٩٩ عينة سليمة.

٤ - التهجين الجزيئي Molecular Hybridization :

بسبب أن طريقة التهجين الجزيئي ذات حساسية عالية وتسمح باستعمال اعداداً كبيرة من العينات في وقت واحد، لذلك يجب استعمال منقيات cDNA. يجب أن يحضر نسخة كاملة الطول من cDNA للفيروس ويجرى لها كلونة في البكتريا *E. coli*.

في طريقة التهجين الجزيئي يؤخذ 3 UI aliquots من العصارة أو من مستخلص الحمض النووي من المادة المراد إختبارها وتوضع على Nitrocellulose filter. يرتبط الحمض النووي مع الفلتر عن طريق التحميص baking و- hybridization. The Filter Pre - بعد ذلك يحضن الفلتر مع العينات - translated PSTVd - nick - p³² dized. وذلك لإحداث تهجين جزيئي في هذه البقع حيث يوجد الفيروس. هذه البقع تصطاد النشاط الاشعاعي الذي بعد ذلك يمكن إكتشافه باستعمال التصوير بالاشعاع الذاتي.

من كمية مطلقة في الصفر ١٢٥ - ٢٥٠ بيكو غرام / بقعة وعلى إفتراض أن ١ غرام من الأوراق تحتوي ٠,٥ مل عصارة يمكن أن نحسب بأن هذا النبات فيه تركيز ٢٠ - ٤٠ نانوغرام من الفيروس لكل غرام من الأوراق ويمكن أن تكتشف بهذه الطريقة. يمكن أن يضاف عينات كبيرة إلى الفلتر. إلا أن هذه التجارب فشلت بسبب أن بعض المواد لا ترتبط بشكل خاص مع الفلتر وتفقد خلال Pre - hybridization.

إن إختبار PAGE أقل حساسية ويمكنه أن يكتشف أى كمية مطلقة بحدود ٢٠٠ نانوغرام من الفيروس لكل حزمة في الإختبار، ويمكن أن يكتشف تركيز ١٠٠ نانوغرام من الفيروس لكل غرام من الأوراق. أما طريقة cDNA تستطيع أن تكتشف ١٢٥ - ٢٥٠ بيكوغرام من الفيروس لكل حزمة في الإختبار، ويمكن

أن يكتشف ٢٠ - ٤٠ نانوغرام / غرام أوراق. يعود ذلك بسبب أن العينات تكون أكبر من طاقة PAGE منه في طريقة cDNA.

مع أن إختبار التهجين الجزيئى على الحساسية ويمكن أن يستوعب أعداداً كبيرة من العينات إلا أنه ليس مناسباً للتطبيقات على نطاق واسع في معامل وقاية النبات.

٥ - طريقة Dot - Blot Hybridization وتكتب DBH :

مقدمة :

إن أكثر طرق التشخيص حساسية وملائمة ومتخصصة لاكتشاف الفيرودات ولا يزال استعمالها جارٍ هي الطريقة القياسية التي تسمى Standered dot - blot hybridization. كان أول تقرير عن اكتشاف كائن ممرض للنبات بواسطة استعمال DBH عن الفيرويد PSTVd وذلك بواسطة العالم Owens et al سنة ١٩٨١. في هذا التكنيك يستعمل شظية من حمض نووى (منقب Probe) إما مشعة أو غير مشعة. هذه الطريقة أصبحت شائعة الاستعمال الآن في كثير من البلدان كطريقة روتينية لاكتشاف مجال واسع من الفيرودات. على الرغم من أن طريقة DBH ملائمة التخصص وعالية الحساسية لبعض الفيرودات حيث أنها يمكن أن تكتشف مدى منخفض جداً ١٠-١٢ غرام (picogram) في كثير من المستخلصات النباتية، إلا أن لها بعض العيوب وهو طول الوقت اللازم للحصول على تحضيرات مستخلص النبات الشامل (٢٤ ساعة تقريباً) ويمكن أن تحتاج ٤٨ - ٧٢ ساعة لاكتشاف المنقب المرتبط. وبالتالي فإنه من المرغوب فيه أن يكون هناك تصميماً لطريقة أسرع، أبسط وحتى أكثر حساسية في التشخيص.

إن الدراسات المبكرة التي كانت تجرى على تهجين الأحماض النووية الفيروسيّة في النبات كانت تستعمل السائل أو محلول التهجين وذلك من قبل-Gould & Sy-mons سنة ١٩٨٣. في هذه الطريقة يحضر خيط مفرد من cDNA فيه فسفور مشع ٣٢ (p³² - cDNA) مقابل لـ RNA لفيرس معين أو فيرويد وهذا يهجن في

محلول لمدة ١٩ - ٢٤ ساعة مع تحضير من حمض نووي منقى جزيئاً من نباتات مصابة. عندئذ يعامل مخلوط التهجين بأنزيم Nuclease S1 والذي هو مخصص للأحماض النووية أحادية الخيط. تحت الظروف المستعملة فإن أى من p^{32} -cDNA احادى الخيط غير مهجن يجرى له عملية تحليل مائية إلى أحادى النيوكليوتيدات أو قطعة صغيرة من قليلة النيوكليوتيدات Oligonucleotides بينما لا يتأثر التهجين الناتج وهو RNA : cDNA - p^{32} ، ما عدا التحليل المائى لأطراف أى حمض نووي احادى الخيط. بالإضافة لذلك فإن أى جزء من p^{32} -cDNA الموجود فى مناطق عدم التزاوج يعنى (عدم التطابق Mismatched) من التهجين الخاطئ لـ: cDNA RNA فإنه يضيعهم. أما التهجينات الباقية الثابتة RNA : cDNA - p^{32} عندئذ تجمع بالترسيب الحمضى وتعد. كان الكنترول دائماً يشمل p^{32} -cDNA مهجناً مع نظيره RNA (هذا يعنى مع RNA الذى عنه كان قد حضر cDNA)، بسبب تهجينات الكنترول هذه فإنه ينشأ ٨٠ - ٩٠٪ من أقصى حد نظرى. بالإضافة لذلك فإن هناك Background control أساسى يتكون من منقب p^{32} -cDNA مهجن مع مستخلص حمض نووي محضر من نباتات سليمة.

هذا التكنيك وصف أساساً لفهرسة فيروس ASBVd وله عدة إنتقادات هى :-

١ - الطبيعة المحملة لهذا التكنيك نفسه.

٢ - يظهر قيم غير واضحة للكميات المحسوبة دائماً أو أحياناً.

٣ - غير مناسبة لدراسة كميات كبيرة من العينات.

وبالتالى فإن تكنيك التهجين فى السائل قد توقف حالياً بواسطة استعمال طرق أكثر كفاءة وحداثة من DBH.

إن أساسيات DBH سهلة حيث أن DNA أو RNA المدتر يجمد فى مكانه على دعامة غير فعالة مثل نتروسيليلوز أو أغشية نايلون بطريقة يمنع فيها التلدن

الذاتي Self annealing بجانب توفر تتابعات للتهجين مع منقّب من حمض نووي مضاف. هذا المنقّب يمكن أن يعلم بنوع من النظائر (p^{32}) أو بإشاري غير نظير nonisotopic ligand مثل بيوتين أو Digoxigenin أو معلّم مباشرة بأنزيم Horseradish peroxidase أو alkaline phosphatase. بعد التهجين يجرى عملية غسل واسعة للرائح يزيل المنقّب المهجن بنسبة بسيطة أو غير المتفاعل. يكون اكتشاف الهجن المرتبطة بواسطة أى من:-

١. Autoradiography .

٢. Enzymatic Colorimetric Detection .

٣. Chemiluminescence .

بينما تعتبر طريقة DBH هي حالياً على نحو عام الطريقة الممتازة لتشخيص مسببات أمراض النبات، إلا أنه يجب أن نتذكر أنها يجب أن تشمل تطبيق مباشر على رايح الحمض النووي غير المجزئ. إن هذه الطريقة لا تميز حجم جزيئات الهجن وبالتالي فإن علامة التهجين تكون عبارة عن مجموع التتابعات المهجنة مع المنقّب تحت الظروف المستعملة. هناك تكتيكان يسمحان بالتحليل الكيفي لأنواع الحمض النووي هي Southern blotting proto- و Northern blotting protocole. هنا فإن أنواع DNA أو RNA أولاً تقسم إلى أجزاء تخلل بواسطة ال Agarose أو بالهجرة الكهربائية في الجيل-Polyacrylamide gel electrophore. ثم بعد ذلك تنقل بواسطة Blotting من الجيل إلى مرشح نتروسيليلوز بيولوجي والذي بعد ذلك يستعمل في التهجين. تدل النتائج على إختلاف الحجم والكميات النسبية التقريبية للأنواع المفردة.

أ: التعرف على الفيرويد باستعمال منقّبات مشعة:

Detection of Viroid by Using Radioactive Probes

إن طرق التعرف على الفيرويدات المبنية على طريقة DBH والمتضمنة استعمال منقّبات مشعة قد استخدمت بنجاح في السنوات الحديثة. لقد أثبتت هذه الطريقة

ثقة وحساسية كبيرتين، وأمكن بواسطتها التعرف واكتشاف الفيروسات الموجودة على مدى منخفض جداً بقدر البايكوغرام في كثير من عصابات النبات. كما هو واضح في جدول رقم ١٣ قائمة بالدراسات التي استعملت في هذا المجال للتعرف واكتشاف العديد من الفيروسات في السنة من ١٩٨٥ - ١٩٩٠. كما يمكن أن نلاحظ فإن هذا التكنيك له مدى استعمال واسع وهو في الوقت الحاضر الطريقة الروتينية المستعملة في التعرف على الفيروسات في كثير من البلدان.

من جدول رقم ١٣ يمكن ملاحظة أن هناك أنواعاً مختلفة من المنقبات قد استعملت في التعرف على الفيروسات في هذه المنقبات.

١ - cDNAs أحادي الخيط (هذا يحضر أما بواسطة primer extension لإعادة الاتحاد في الفاج M_{13} DNA أو بواسطة النسخ العكسي للحمض RNA الفيروسي).

٢ - إعادة الاتحاد Recombinant لـ DNA ثنائي الخيط.

٣ - RNAs ذات خيط وحيد مصنعة في المعمل.

٤ - نيوكليوتيدات قصيرة محضرة صناعياً.

إن أكثر الطرق شيوعاً لتحضير المنقبات هي إعادة الاتحاد لكلونات DNA، مثل هذه الكلونات تسمح بالعزل لكميات كبيرة من الحمض النووي، وهكذا تكون ضرورية للمدى الواسع من العمل التشخيصي. وكذلك فإنها تزود العمل بتخصص عال ومصدر يمكن تجديده بسهولة. هناك شرح كبير عن المنقبات وتحضيرها واستعمالها مذكور بواسطة McInnes & Symons سنة ١٩٨٩ في كتاب Nucleic acid probes.

جدول رقم ١٣ : دراسة Dot - blot Hybridization : التعرف على مدى من الفيريكولات باستعمال المنقبات المشعة من سنة ١٩٨٥ إلى سنة ١٩٩٠.

الفيريكولات	رقم المنقبات	المستخلص	مدى الصساسية على RNA الفيريكولات بالنيكوتراغرام
ASBVd	١	حمض نووي منقبي جزئياً	٥
	٣	عصارة ورقة افوكادو	-
	١	حمض نووي من ورقة افوكادو	-
ASSVd	٤	RNA الكلى، جلد لدرة الفلاح، تلف أو ورقة، بلور.	-
CCCVd	١	حمض نووي ورقة نخيل جزئ الهند.	-
CCCVd	١	حمض نووي، ورقة نخيل جزئ الهند أو ورقة نخيل الهند.	-
CEVd	١	عصارة الأفوكاد أو حمض نووي من النباتات.	١٠٠ - ٥٠
		<i>Gynera surinlensis</i>	
CEVd	١ و ٤	حمض نووي، ورقة حمضيات أو تلف ورقة الأفوكاد.	-
CSVd	٢	عصارة الأفوكاد.	٥
	٢	حمض نووي ورقة الأفوكاد.	-
	٥	عصارة الأفوكاد.	أقل من ١
HSVd	٢	حمض نووي ورقة حشيشة الدنار	-
PSTVd	٢	عصارة بطاطس، تدموات بطاطس.	٨٠
	١	حمض نووي، ورق بطاطس أو طماطم.	-
	٤، ٢	مخلوط متجانس من ورقة بطاطس أو طماطم.	١١، ٢ - ١، ٤
	٢	حمض نووي خلم، ورقة بطاطس أو طماطم.	٥٠
	١	حمض نووي ورقة بطاطس أو ذرة.	-
	٤، ٢، ١	مخلوط متجانس من ورقة طماطم، ورقة بطاطس، تبرعات بطاطس أو بلور حبيبات البطاطس، ذرة بطاطس.	١٠٠ - ٢٣
	٢، ١	حمض نووي، ورقة بطاطس أو طماطم.	-
	٢	عصارة خلية ورقة طماطم.	٢٠
	٤	حمض نووي، ورقة طماطم.	حوالي ١
	٥	عصارة طماطم.	أقل من ١

أرقام المنقبات كلف:

١ = غير واضح من cDNA ، ٢ = إحداهما بلازم DNA على الحيد

٢ = أقل من الفيريكولات المشعة، ٤ = Sp6 RNA Polymerase transcript.

٥ = T₃ or T₇ RNA polymerase transcript.

فيما يتعلق بطبيعة ونقاوة مستخلص الحمض النووي من النبات المنقول على تروسيليلوز أو نايلون، فإن العينات يمكن أن تختلف بشكل كبير (جدول ١٣). ومن الجدير بالاهتمام أن الفيروسات بتركيبها الثانوي الحال من RNA ترتبط مع التروسيليلوز بدون متطلبات الخطوة الأولى من الدنترة، من المحتمل أن تحدث الدنترة خلال خطوة التحميص على درجة ٨٠ م^{٨٠} *in vacuo* لمدة ساعتين وذلك لتجميد عينات ال RNA على الفلتر. يحصل على أقوى علامات التهجين عادة باستعمال عينات غير بروتينية نظراً لأن التجمد المشترك للبروتين يتنافس مع الحمض النووي على مواقع الارتباط وتنضم أيضاً إلى ال Background. لهذا السبب فإن كثيراً من إجراءات طريقة DBH في الاستعمال الحالي تستخدم درجة تنقية الفيئول. على أية حال وكما يمكن ملاحظته من جدول رقم ١٣ فإن كلاً من عصارة النبات ونسيج الورقة المتجانس نسبياً يمكن أن يضاف إلى التروسيليلوز مؤدية إلى إكتشاف الفيروس.

لقد تم بنجاح تطوير طريقة مثالية من DBH بمنقبات cDNA - $32p$ للاكتشاف الروتيني لكثير من فيروسات النبات. فمثلاً إن فيروس ASBVd قد تم اكتشافه عند وجوده على مستوى منخفض يقدر بحوالى ٢٠ بيكوغرام لكل وزن غرام واحد من الأوراق الطازجة، باستعمال مستخلصات حمض نووي منقى جزئياً. المنقّب الذى كان يستعمل روتينياً هو خيط مفرد من cDNA معلماً بفسفور مشع $32p$ وكان يحضر من إعادة الاتحاد لكلونة DNA محتوية على كلونة ذات طول كامل من ال monomer تدخل في ASBVd فى الخيط المفرد من الناقل phage M13. هذا الموضوع أثبت بأنه ذو فائدة كبيرة فى السنوات الأخيرة عند اكتشاف عديد من الفيروسات فى مدى مختلف من مستخلصات نبات من استراليا.

لقد ذكر White & Bancroft سنة ١٩٨٢ أنه من الممكن إحداث زيادة معتبرة فى قوة إشارة الهجين بواسطة إجراء معاملة لفترة وجيزة للنسيج أو مستخلص الخلية بـ ٢٠٪ (W/V) فورمالدهيد لكل ١٠× SCC محلول لمدة ١٥ دقيقة على ٦٥ م.

قبل نقلها على التتروسيليز وقبل تحميتها في *in vacuo* على درجة ٨٠°م لمدة ساعتين. عندما تضاف إلى مستخلصات نبات من الأقحوان، جوز الهند أو نخيل الزيت أو من البطاطس أو الطماطم لتشخيص الفيرويد فإن زيادة مشابهة في قوة إشارة التهجين قد لوحظت. هذه الملاحظة يمكن أن تكون بسبب الدنترة الكمية للحمض RNA في الفيرويد و / أو بسبب الارتباط العال مع التتروسيليز. ولسوء الحظ فإن المستخلصات المضرة من نسيج نبات مصاب بـ ASBVd أو HSVd ومعامل الحرارة مشابهاً لما هو في حالة وجود الفورمالدهيد ويظهر روتينياً خفض في قوة الإشارة بعد التهجين. هذا التأثير كان متغيراً إلى حد ما، بينما معظم المستخلصات أظهرت نقصان ملحوظ في الإشارة، يعطى المستخلص العرضي نقصان غير ملموس. إن الطبيعة الحقيقية للعوامل الداخلة في ذلك لم يجرى عليها اختبارات زيادة. وعلى أية حال فإن معاملة مستخلصات النبات المصاب بفيرويد HSVd و ASBVd في غياب الحرارة قبل خطوات نقلها وتحميصها يعطى تقريباً زيادة الضعف في قوة إشارة التهجين.

ب: التعرف على الفيرويد باستعمال منقبات غير مشعة:

Detection of Viroid by Using Non - radioactive Probes

١ - منقبات معاملة بالبيوتين Biotin - Labeled Probes

إن الحاجة إلى طرق تشخيصية روتينية للفيرويد مبنية على إجراءات بسيطة لا يستعمل فيها الإشعاع أصبحت الآن في متناول اليد. هناك طرق عديدة متوفرة الآن في تعليم الحمض النووي ومنقبات من نيوكليوتيدات قصيرة تسمى nonisotopically بواسطة إما تقنيات أنزيمية أو كيميائية. يحوى جدول رقم ١٤ قائمة دراسات على طريقة DBH مستعمل فيها منقبات RNA و DNA معاملة بالبيوتين Biotinylated للتعرف واكتشاف مدى من الفيرويدات أجريت من سنة ١٩٨٨ - ١٩٩٠. ومن جدول رقم ١٤ يتبين لنا أن طريقة التعليم المفضلة حالياً لتعليم منقب الفيرويد nonisotopic هي التعليم بالبيوتين.

لقد استعملت المواد Photobiotin و Photoactivatable analogue of biotin لإنتاج منقبات من إعادة الاتحاد لـ DNA معاملة بالبيوتين للتشخيص الروتيني للفيروسات في مستخلصات النبات. يتكون آل Photobiotin من بيوتين مرتبطاً مع ذراع رابط مشحون يوصل بمجموعة Photoreactive aryl azide. عندما يعرض مخلوط من حمض نووي و Photobiotin إلى ضوء قوى واضح لمدة ١٥ - ٢٠ دقيقة فإن مجموعة aryl azide تنقلب إلى aryl nitrene شديد التفاعل والذي يسمح بتكوين روابط مع الحمض النووي. مع أن الأصل الدقيق (الصحيح) ومواقع الروابط غير معروفة فإن الرابطة تكون ثابتة تحت ظروف التهجين القياسية ومن المفترض أنها تساهمية. تحت الظروف المحددة والموصى بها فإن بيوتين واحد يقترن مع كل ١٠٠ - ١٥٠ قاعدة من الحمض النووي. مثل هذا المدى من التعليم يكون من غير المحتمل لأن يتدخل في تهجين المنقب المعامل بالبيوتين مع تتابعات الهدف المتتامة (المتتمة لبعضها البعض).

إن منقبات DNA المعاد صياغتها Recombinant والمعاملة بالبيوتين المذكورة سابقاً تحتوي إما جزء من الطول أو الطول الكامل لـ monomer Viroid مغروزة في ناقلات البلازميد pSP64 أو pUCq حيث تستعمل بنجاح للتعرف على HSVd، CSVd، CCCVd، ASBVd، PSTVd في مستخلصات حمض نووي منقى جزيئياً مأخوذ من أنسجة النبات. مستخلصات النبات المأخوذة من مدى واسع من عينات الحقل توضع على نيتروسليلوز وتعرض للتهجين، DNA المعلم بالبيوتين الذي ارتبط مع الحمض النووي الهدف اكتشف عن طريق إتحاده مع - an avidin alkaline phosphate. تحت طريقة التهجين المعينة وظروف الغسيل، فإن كل منقب مفرد لفيرويد كان متخصصاً وكل فيرويد كان يكتشف بحساسية مشابهة لتلك المتحصل عليها عند استعمال نفس أو شبه المنقب المعلم بالفوسفور المشع.

جدول رقم ١٤: دراسات على DBH لاكتشاف مدى من الفيرونات باستعمال منقبات غير مشعة. الدراسة من ١٩٨٨ - ١٩٩٠.

الفيروس	نوع المنقب	نظم المنقب	المستخلص	مدى للصاسبة بالبيكوغرام
١ - ASBVd	١	فوتويوتين	حمض نووي، ورقة افوكادو	٥
٢ - CCCVd	١	فوتويوتين	حمض نووي، ورقة نخيل جزر الهند	لم تحدد
٣ - CSVd	١	فوتويوتين	حمض نووي، ورقة أفجوان	لم تحدد
٤ - CSVd	٣	Bio - 11 - UTP	عصارة أفجوان	٥
٥ - HSVd	١	فوتويوتين	حمض نووي، ورقة حنشة اللينار	لم تحدد
٦ - PSTVd	١	فوتويوتين	حمض نووي، ورقة طماطم أو بطاطس	لم تحدد
٧ - PSTVd	٢	Bio - 11 - UTP	حمض نووي، ورقة طماطم	٨٠
٨ - PSTVd	٣	Bio - 11 - UTP	عصارة طماطم	٥

المنقبات:

DNA = بلازمد فيلي الخط سداد سيات، ٢ = Sp6 RNA polymerase.

٢ = نسخة من T₃ or T₇ RNA polymerase.

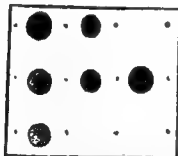
يظهر في شكل ١٩ دراسة نموذجية لطريقة DBH بدون إشعاع لاكتشاف RNA للفيروس HSVd. حضرت مستخلصات من نسيج ورقة مصابة (بقع ٢، ٤ إلى ٧) أعطت إشارات موجبة للتهجين، بينما المستخلصات المحضرة من مواد ورقة سليمة (بقع ٣، ٨، ٩) أظهرت عدم التهجين. كما هو متوقع فإن ٢٠٠ بيكوغرام RNA للفيروس HSVd نقى (بقعة ١) أعطت إشارة تهجين قوية.

هناك طريقة بديلة لاكتشاف الفيروس بواسطة وسائل غير مشعة، يكون باستعمال منقب RNA معادل بالبيوتين (Biotinylated RNA). هنا تتم معاملة RNA بالبيوتين في فاج نظامي Sp6 عن طريق نظام نسخ RNA polymerase باستعمال رايبونوكليوتايد معاملة بالبيوتين (Bio - 11 - UTP) الذي يكون فيه

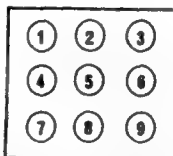
الرايوز متناظراً مع Bio - 11 - deoxyuridine triphosphate والذي يكتب باختصار (bio - 11 - dUTP). مثال على ذلك لتحضير Sp6 RNA أحادي الخيط معاملة بالبيوتين لاستعماله كمنقب، فإن تتابع DNA مناسب يكون أولاً في ناقل مناسب والذي يحوى المحفز Sp6 قبل بدء النسخ من المنطقة عديدة الوصلات (ناقلات pSP64 و pS p65). بعد جعل DNA clone بشكل مستقيم بعد بدء النسخ من الجزء الداخلى المكون، فإن RNA المنسوخ ذو الطول المحدد ينتج بواسطة Sp6 RNA polymerase مستعملاً GTP، CTP، ATP و bio - 11 - UTP كمواضع تفاعل.

بالإضافة إلى النظام المذكور سابقاً فإن فاج T₃ RNA polymerase و T₇ يمكن أن يستعمل بطريقة مشابهة. ول سوء الحظ فإن RNA Polymerase الثلاثة فاجات (T₃, T₇, SP6) تختلف في مقدرتها على ادخال bio - 11 - UTP فى الحمض RNA. إن أنزيم الفاج T₃ يدخل bio - 11 - UTP بأعلى كفاءة وإن يصنع تقريباً ثلاثة أمثال الحمض RNA المصنع بواسطة أنزيم الفاج SP6 وضعف ما يصنعه أنزيم الفاج T₇. وعلى أية حال فإن منقبات RNA المعامل بالبيوتين وجد أن استعمالها محدد فى تشخيص الفيروس. كما هو فى جدول ١٤ استعمل فى اكتشاف CSVd و PSTVd فى مستخلصات النبات.

A



B



شكل رقم ١٩ :

اكتشاف فيروس قزم حشيشة التبنا فى أوراق حشيشة التبنا الاسترالى بواسطة التحليل بطريقة Dot - blot hybridization. عينة رقم ١ حتى ٢٠٠ بيكوغرام منقى من RNA للفيروس HSVd، عينة ٢ تعنى نسيج مصاب من فيروس HSVd. عينة ٣ نسيج سليم من حشيشة التبنا. العينات من ٤ - ٩ عينات مأخوذة من نباتات نامية فى الصوب الزجاجية. B مواقع العينات على غشاء نتروسيليلوز.

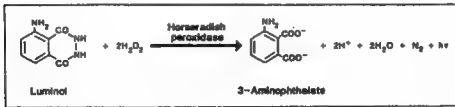
٢ - منقبات معملة بالداى جوز جنين Digoxigenin labeled Probes :

إن مادة الداى جوزجنين عبارة عن ستيرويد نباتى والذى يتكون على وجه الحصر فى نبات *Digitalis*، يمكن أن يستعمل كإشارى بديل Alternative ligand للبيوتين وذلك لتحضير منقبات من RNA ومن DNA معاد صياغته. مع أن هذه الطريقة قد وجدت تطبيقاً مباشراً فى تشخيص الفيروسات، إلا أنه لا يوجد أى سبب يوضح لماذا لم تقابل نجاحاً كبيراً. التعليم الأنزيمى للداى جوزجنين فى منقب DNA يكون متمماً بواسطة Random - primed أو Nick translated تندمج مع Digoxigenin - 11 - deoxyuridin triphosphate والتى تكتب باختصار (dig - dUTP) مستعملاً أنزيم Klenow أو بواسطة النهاية 3' لمنقبات DNA المعلم والذى هو أقل من ٢٠٠ قاعدة زوجية مع وجود أنزيم transferase الطرفى Terminal transferase. كما وأن المنقبات من RNA المعلمة بمادة داى جوزجنين يمكن أن تصنع فى العمل بنسخ ال DNA أو الكلوثة قبل بدء النسخ فى كل من SP6، T7 أو مناطق المحفز أو تتابع الابتداء Promoter فى T3 مع استعمال ال polymerase الخاص واستعمال dig - UTP كمادة تفاعل. كما وأن تعليم منقبات إما DNA أو RNA يمكن أن تتحقق بواسطة الأشعة فوق البنفسجية المحفزة catalyzed تندمج مع Photodigoxigenin أو كاشف يحتوى داى جوزجنين مرتبطاً مع ذراع مبادئ مع مجموعة azido - Phenyl (Photoactivated). إن الإشعاع بالأشعة فوق البنفسجية ($260 \text{ nm} < \lambda < 300 \text{ nm}$) تؤدي إلى تفاعل غير معكوس ذو ازدواج ثابت واندماج حوالى واحد من الداى جوزجنين لكل ٢٠٠ - ٣٠٠ من المتبقى.

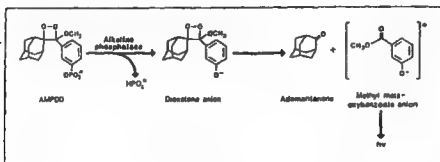
بعد التهجين مع الحمض النووى الهدف، فإن الهجن تعرف بواسطة ELISA باستعمال تزاوج الأجسام المضادة (هذا يعنى تزاوج Anti - digoxigenin alkaline Phosphate) وتفاعل لوني للمحفز الأنزيمى. إن اكتشاف المنقبات المعاملة بالداى جوزجنين بواسطة الكيمياء المتألقة Chemiluminescence يكون أيضاً إختيار

إن كلاً من منقبات الحمض النووي المعلم بالبيوتين المتحد مع-Avidin streptav-
 idin - alkaline phosphatase والمنقبات قصيرة النيوكليوتيدات المعلمة مباشرة
 بمادة alkaline phosphatase يمكن أن تكتشف بسهولة على أغشية خلال
 تفاعلات تهجين عادية وباستعمال فلم أشعة X. إن الميكانيكية التي تؤدي
 إلى AMPPD الكيماوية المتألقة في وجود alkaline phosphatase يشمل خطوتين
 وظاهرة في شكل ٢١. في الخطوة الأولى يحدث فصل للفوسفات بواسطة أنزيم
 alkaline phosphatase ويتولد مادة ثابتة نسبياً اسمها Dioxetane anion. أما الخطوة
 الثانية فتشمل تحطيم كبير للمادة Dioxetane anion لتكون مادة Adamantanone
 وتنقل الشحنة ويتكون حالة مثارة (متهيجة) من مادة Methyl meta - oxybenzoates
 anion والتي ينبعث منها إضاءة. عند مقارنة حساسية كل من AMPPD ومادة
 الكروموجينك BCIP / NBT والتي تتكون من 5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indo-
 1-yl - phosphate / nitro blue tetrazolium salt monohydrate

في التعرف على alkaline phosphatase. قد أجريت في اختبار تهجين
 منقّب DNA مع أنتجين DNA المركزي لفيروس التهاب الكبد B. إن حساسية
 الإختبار قد تحسنت بأكثر من رقتين تكبير باستعمال موضوع الكيماويات المشعة
 وباستعمال مادة AMPPD أيضاً تقلل وقت الاكتشاف من ٢٤٠ دقيقة تقريباً إلى
 ٣٠ دقيقة.



شكل رقم ٢٠:
 صيغة تفاعل الكيماويات المتألقة الدخّل فيه ليمونول.



شكل رقم ٢١ :
تفاعل الكيماريات المتألقة الداخل فيه AMPPD.

الاتجاهات المستقبلية لتكنولوجيا المنقب

Future Directions of Probe Technology

مقدمة :

بينما يعتبر إختبار Dot - blot hybridization ويرمز له DBH لاكتشاف الفيرويد من الاختبارات الشائعة الاستعمال كما هو واضح من جدول ١٤، ١٣، إلا أن هناك عدة إنتقادات له. لكي نستبعد المشاكل الأساسية فيما يتعلق بالمنقيات غير المشعة، فمن الإجراءات العادية هو تحضير مستخلص نباتى منقى جزئياً لعملية ال DBH، العملية التى تشمل عادة خطوة لإزالة البروتين بالفينول و / أو الكلوروفورم على أية حال بينما النسغ (عصارة النبات) المعصور وغير المنقى يمكن أن يستعمل أحياناً (جدول ١٤)، هنا يمكن أن يحدث تخفيض فى حساسية الاختبار، وكفاءة تهجين المكونات الأخرى فى العينات السليمة تزداد. إن الحساسية المنخفضة ليست ذات إعتبارات هامة عندما يكون تركيز الفيرويد فى العصارة مرتفعاً نسبياً، ولكن يكون ذو إعتبارات هامة عندما يكون التركيز منخفضاً ومن المهم كشف جميع النباتات المصابة. ومثال على الحالة الأخيرة هو اكتشاف فيرويد ASBV فى أشجار الافوكادو مصممة على أساس استعمالها كأصل ليستعمل للبذور أو التطعيم الخشبي. هنا فإن خطوة لإزالة البروتين وتركيز الحمض النووى قبل إختبار DBH يكون مطلوباً بشكل واضح.

هناك بالتأكيد حاجة إلى إجراءات إستخلاص بسيطة ويفضل تقليل الخطوات كلما أمكن ذلك واستبعاد استعمال الفينول لإزالة البروتين. وبالنسبة لأعداد كبيرة من العينات، فإن مستخلص النسيج يجب أن يكون غير معقد نظراً لأن الإجراءات المعملية العادية مثل التجانس فى الخلاط أو السحق فى هاون ومدقة تكون غير عملية. إلا أنه بوجود مستخلص للعصارة من ماركة Eric pollahne, Germany يكون ذو كفاءة عالية، ويمكن أن يستعمل للأنسجة الطرية مثل الطماطم، البطاطس وأوراق حشيشة الدينار وبالإضافة لذلك أوراق الأشجار الخشبية مثل الأفوكادو ونخيل الزيت. إن إختبارات ال DBH مملّة أيضاً فى متطلباتها لنقل حجم صغير من كل عينة على غشاء فلتر والتسخين لتجميد الأحماض النووية قبل التهجين ثم عندئذ تهجن قبل الغسيل وقبل التصوير بالإشعاع الذاتى، يتكشف التلون الأنزيمى أو الكيمائيات المتألّفة.

سيكون من المفضل تطوير تكنولوجيا منقّب لتشخيص الفيروس بحيث لا تكون الإشارة مثلاً منتج غير ذائب ملون على غشاء فلتر، ولكن يكون منتج ذائب ملون أو بعض المنتجات الذائبة الأخرى كلاهما يمكن أن يقاس بطرق مناسبة مثل ELISA والنتائج النهائية تطبع فى مكان معين. هذا الموضوع يكون أساسى لجعل نظام الكشف أوتوماتيكياً. وفيما يلى بعض الأبحاث المستقبلية لتشخيص الفيروس.

١ - التزايد العددي الأنزيمى للحمض النووى الهدف:

Enzyme Amplification of Target Nucleic Acid

إن من المثير نوعاً ما للدهشة أنه مع جميع طرق الكشف المشعة وغير المشعة المتوفرة لتشخيص الفيروس جدول ١٤، ١٣، فإن المستوى المنخفض فى الكشف

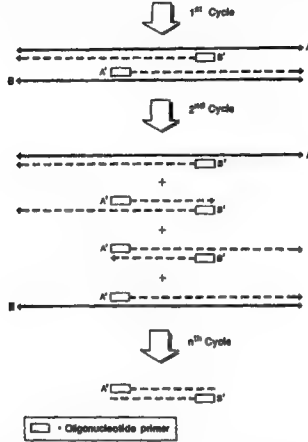
عن الأحماض النووية الهدف، يكون دائماً فى مستوى بيكوغرام منخفض. مع أن هذه الحساسية تكون دائماً ملائمة لمعظم الفيريدات التى تكون موجودة بتركيزات مرتفعة نسبياً فى مستخلصات النبات. أيضاً فإن حساسية أكبر تكون مطلوبة بالنسبة للفيريدات الموجودة على تركيزات منخفضة أو حيث يوجد قيوداً على كمية عينة النسيج المتوفر. من ناحية نظرية فإن حساسية الكشف يمكن أن تتحسن عن طريق زيادة عدد جزيئات الحمض النووى الهدف فى العينة الأصلية. مثل هذا البحث قد تطور وفقاً للزيادة العددية الأنزيمية التى تحدث فى تفاعلات الحمض النووى الخاصة بالهدف فى المعمل بنمط أسى ودقة عالية. إن هذا التكنيك يشار إليه باسم طريقة سلسلة تفاعل البوليميريز-Polymerase Chain reac (PCR) tion وهو موصوف فى شكل ٢٢. إن طريقة PCR مبنية على دورات متكررة من:-

١ - الدترة بالحرارة لقلب ثنائى الخيط.

٢ - بادئ معاد إتحاده Annealing من مجموعة نيوكليوتيدات قصيرة.

٣ - إطالة البادئ المعاد إتحادها بأنزيم DNA Polymerase.

يحدد الهدف المخصص عن طريق إختيار بادئين قصيرين (مثلاً ٢٠ - ٢٥ نيوكليوتيدة) والتى تصمم لتجهن مع خيوط DNA المتقابلة مضافة إلى جانبى التابع لتزداد فى العدد مع كون نهاياتها 3' تتجه إلى الداخل. تؤدى الدورات المتلاحقة من الزيادة العددية إلى استمرار التضاعف والزيادة الأسية فى عدد نسخ التابع. نظراً لذلك يصبح هناك نسخاً مصنعة جديدة متوفرة لترتبط مع البادئ شكل ٢٢. وبالتالى فإن عشرين دورة من PCR تنتج نظرياً ما يزيد عن مليون ضعف من الأعداد المتزايدة.



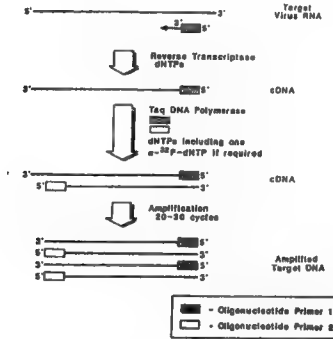
شكل رقم ٢٢ :

تضاعف DNA الهدف بواسطة سلسلة تفاعل البوليميريز (PCR). قالب DNA الأصلي. A. الخيط الأول و B. للخيط الآخر. A', B' بادئ النيوكليوتيدات القصيرة. الخيوط المقطعة تمثل DNA المبني في المعمل.

وبشكل أولي فإن Klenow fragment من DNA Polymerase للبكتريا *E. coli* كان قد إستعمل في PCR لإطالة البوادي المعاد إتخاذها Annealed. وعلى أية حال فإن هذا الأنزيم كان قد تثبيط بواسطة الحرارة العالية المطلوبة لفصل خيطي ال DNA في بداية كل دورة من PCR. وبناء على ذلك يجب إضافة أنزيم جديد خلال كل دورة. إن إدخال أنزيم Taq DNA Polymerase الثابت حرارياً المعزول من البكتريا *Thermus aquaticus* حول عملية ال PCR إلى تفاعل بسيط وقوى، هذا

بدوره سمح بجعل هذا الإجراء أوتوماتيكياً مع فوائد المهمة من سرعة، تخصصية، حساسية وملائمة.

قام العالم Rathjen سنة ١٩٨٩ بإجراء بحث يهدف إلى الزيادة العددية في طريقة PCR كطريقة روتينية ممكنة للتعرف على المستويات المنخفضة من فيروس ASBVd في نسيج الأفوكادو المصاب. نظراً لأن PCR تتطلب قالب من DNA فيجب أن يصنع نسخة معكوسة من RNA الفيرويدي قبل الزيادة العددية. وبالتالي فإن هذا الإجراء يتطلب خطوتين عمليتين كما هو مذكور في شكل ٢٣.



شكل رقم ٢٣:

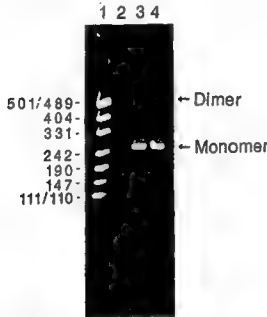
مرحلتين من إجراءات اكتشاف مستويات منخفضة من RNA الفيروسي الهدف في مستخلص نباتي باستعمال طريقة PCR. الخط الأول هو cDNA وبين بواسطة النسخ العكسي لقالب RNA. كما وأن التضاعف باستعمال PCR لـ cDNA يحصل عليه باستعمال Taq DNA بوليميريز.

خيط أولى مكمل من DNA وهو (cdNA) يجب أن يصنع بشكل أساسي بواسطة النسخ العكسي للقالب RNA في وجود البادئ الأول و dNTPs. عندئذ يمكن أن يستعمل الـ DNA كقالب للزيادة العددية في PCR عن طريق إضافة البادئ الثاني وأنزيم Taq DNA polymerase. عادة ما يلزم إضافة أكثر من البادئ الأول و dNTPs. ولسوء الحظ فإن بناء الخيط الأول من cdNA الفيرويدي بواسطة أنزيم النسخ العكسي في كثير من الأحيان يكون أقل كفاءة من نفس التفاعل المستعمل فيه mRNA كقالب بسبب المميزات العالية للتركيب الثانوي للفيروسيدات، عندما يحدث لها إعاقة بواسطة التركيبات الثانوية للحمض RNA، فإن أنزيم النسخ العكسي يميل إما إلى البناء (النسخ) الطرفي أو ينقلب عكسياً ويبني شريط ثانوي من cdNA ثم نسخه من الخيط الأول لـ cdNA الوليد. وبالتالي فإن العالم Rathjen وضع الظروف المثلى لدثرة الفيروس قبل خطوة النسخ العكسي.

إن شكل ٢٤ هو النتيجة للزيادة العددية في طريقة PCR المثلى (٣٠ دورة) باستعمال مستخلص حمض نووي منقى جزيئياً من أوراق أفوكادو سليمة ومصابة. إن الزيادة العددية الناتجة (مر ٣ و ٤) من المستخلصات المصابة توطدت وثبتت على ٢٣ TAE أجاروس جيل Agarose gel ويعمل على إظهارها بواسطة Ethidium bromide fluorescence. يكون الانتاج الأساسي في الإكثار ظاهر وبوضوح وبطول ٢٥٠ نيوكليتيده تقريباً (باستثناء مونومرك ASBVd فيكون ٢٤٧ نيوكليتيده) إن الحزمة ذات الوزن الجزيئي الأعلى ذات طول ٥٠٠ نيوكليتيده تقريباً ظهرت على الجيل (مر ٣ و ٤)، من المحتمل أنها تتوافق مع تكاثرات ASBVd dimer والذي من المعروف أنه موجود بتركيزات منخفضة في أوراق الأفوكادو. لم يكن هناك إنتاج واضح عند استعمال مستخلص أوراق سليمة كقالب (مر ٢). هناك زيادة في الحساسية على الأقل ١٠٠٠ ضعف لعملية الـ PCR، هذه عند مقارنتها مع طريقة DBH القياسية بمنقبات حمض نووي معلم بالفسفور ٣٢.

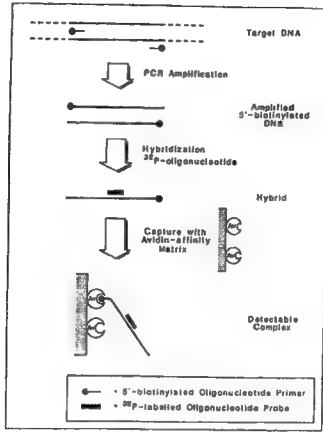
METHOD	PCR round 1 Primers: P1, P2	PCR round 2 Primers: P3, P4	Labelling of PCR product	Detection
1 - Agarose gel electrophoresis	Nonlabeled	---	Nonlabeled	Ethidium bromide fluorescence
2 - Polyacrylamide gel electrophoresis	Non labeled	---	p32	p32- autoradiography
3 - Affinity collection with avidin (or streptavidin)	Biotin - labeled	---	p32	Liquid scintillation counting
4 - Affinity collection with avidin (or streptavidin)	Biotin - labeled	---	Biotin	Hybridization with p32- labeled oligonucleotide; liquid scintillation counting
5 - Affinity collection with avidin (or streptavidin)	Biotin - labeled	---	Biotin	Hybridization with alkaline phosphatase - labeled oligonucleotide; enzymatic colorimetric assay Immunoenzymatic colorimetric assay
6 - Affinity collection with avidin	Non labeled	P3, biotin - labeled; P4, dinitrophenyl (DNP) - labeled	Biotin / DNA	
7 - Affinity collection with avidin	Non labeled	P3, biotin - labeled; P4, 125I - labeled	Biotin 125I	Gamma Counting
8 - Affinity collection with DNA - binding protein, GCN4	Non labeled	P3, biotin - labeled; P4 contains GCN4 binding site	Biotin / GCN4 binding site	Enzymatic colorimetric assay
9 - Affinity collection with DNA - binding protein TyR	Non labeled	P3, biotin - labeled; P4 contains TyR binding site	Biotin / TyR binding site	Enzymatic colorimetric assay

هناك أنواعاً من الطرق متوفرة حالياً للتعرف على ناتج ال PCR. إن جدول رقم ١٥ يذكر بعضاً من أكثر الطرق إنتشاراً والمستعملة حالياً. إن فحص ناتج ال PCR بعد الهجرة الكهربائية في الجيل إما بـ Ethidium bromide fluorescence أو بالتصوير بالإشعاع الذاتي فسفور ٣٢ (جدول ١٥ طريقة ١، ٢). استعمال الوزن الجزيئي كتعريف منفرد. ومن سوء الحظ فإن إحدى المشاكل هنا هي الكلوونات الخاطئة التي يمكن أن تنشأ إذا ظهرت ناتجات إكثار غير حقيقية لأشياء لها نفس الحجم تقريباً كما هو متوقع لفيروس معين. يمكن التغلب على هذه المشكلة عن طريق الاكتشاف المتخصص لناتجات الإكثار بواسطة التهجين بمنقب مشع (داخلي) متبوعاً بطريقة مجموعة هجن القواعد المتجاذبة Affinity - based hybrid collection. هذا البحث (في جدول ١٥ طريقة ٤) قد تطور أساسياً بواسطة Syva- nen et al سنة ١٩٨٨ لاكتشاف DNA في فيروس تضخم الخلية في الإنسان Cytomegalovirus متبوعاً بالإكثار في PCR وطورت إلى أكثر حداثة بواسطة العالم Harju et al سنة ١٩٩٠. يبين شكل ٢٥ الخطوات العريضة لهذه الطريقة.



شكل رقم ٢٤:

طريقة الإكثار باستعمال PCR للحمض RNA في الفيروس ASBVd الموجود في مستخلص ورقة أفوكادو تتبع خطوة نسخ عكسي أولية. شريحة ١ تعني ٥٠٠ نانوغرام HpaII مهضومة في pUC DNA 19 كدليل. شريحة ٢ = مستخلص ورقة أفوكادو سليمة. شريحة ٣ و ٤ = مستخلص أوراق مصابة إصابات مختلفة من فيروس ASBVd.



شكل رقم ٢٥:

رسم تخطيطي يبين خطوات طريقة

Affinity - based hybrid Collection method لإكتاف DNA الهدف بالبيوتين.

تستخدم هذه الطريقة منقبات معاملة بالبيوتين في 5' لإدخال بقايا البيوتين في أجزاء ال DNA الهدف خلال عملية الإكثار العددي في PCR. إن أجزاء ال DNA المعاملة بالبيوتين في 5' والمتكاثرة عندئذ يمكن اكتشافها بواسطة التهجين في المحلول مستعملاً منقباتاً من مجموعة نيوكليوتيدات قصيرة معلم بالفسفور المشع ³²P. الهجن المعلمة بالفسفور المشع إما أن تجمع على Avidin - coated polystyrene microparticles أو Streptavidin - coated microtitre wells. إن حاصلين على فوائد تفاعل البيوتين مع الأفيدين وهو ما يسمى Streptavidin. إن

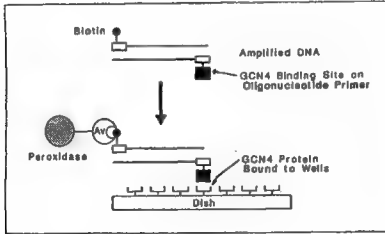
إشعاعية الهجن المرتبطة على دعامات صلبة يمكن عندئذ قياسها شكل ٢٥. إن طريقة مجموعة الهجن للقواعد المتجاذبة Affinity - based hybrid collection (ABHC) تكون فعالة وتكون مقياس لكمية الـ DNA المنتج في عملية الإكثار في PCR.

هناك بديلاً للطريقة المذكورة سابقاً هو استعمال المنقب المتكون من - Enzyme linked oligonucleotide (الداخلي) لاكتشاف النواتج المتكاثرة لـ PCR المعاملة بالبيوتين على 5 متبوعاً بطريقة مجموعة هجن القواعد المتجاذبة ABHC. جدول ١٥ طريقة ٥. من هذه المنقبات Alkaline phosphatase labeled يمكن أن يحضر في المعمل حسب طريقة Li et al سنة ١٩٨٧. باستعمال مثل هذه الطريقة فقد أمكن اكتشاف الهدف في DNA المتكاثرات باختبار قياس الألوان Colorimetric لفيروس ASBV باستعمال Para - nitrophenyl phosphate كمادة تفاعل واستعمال Avidin - coated microtitre plate كمادة صلبة سائدة، إلا أن هناك بعض العيوب لمثل هذه الطريقة.

هناك أبحاثاً عديدة قد طورت هذه الطرق وأدخلت فيها بعض الاختلافات، فمثلاً Sauvaigo et al سنة ١٩٩٠ استعمل دورتين من الإكثار في PCR مستفيداً من الإجراء الثاني لـ PCR لإدخال بواقي معالجة بالبيوتين وتحمل علامات في مخلوط PCR (جدول ١٥ طريقة ٦ و٧). هذا أدى إلى إنتاج هجن من DNA تحمل جزء بيوتين على إحدى النهايات وداي تتروفينائل DNP معلم أو يود مشع ١٢٥ على النهاية الأخرى. بعدئذ فإن النواتج المتكاثرة تنتزع بواسطة جزئ البيوتين على Avidin - affinity matrix وبعد ذلك تكتشف باستعمال نظام Enzyme antibody أو عداد جاما.

أما العالم Kemp et al سنة ١٩٨٩ فقد أحدث تطوراً في إجراء الاكتشاف بقياس الألوان لنواتج الـ PCR (جدول ١٥ طريقة ٨) مستعملاً DNA ثنائي

الخيوط مرتبطاً مع بروتين اسمه GCN4 هذا البروتين عزل عن طريق استعمال ناقل تعبير خاص Constructed في بكتيريا *E. coli*، وهو بروتين إندماجي ويحتوى قطعاً من العامل الناسخ GCN4 من الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* مندمجاً مع Glutathione S - transferase من *Schistosoma japonicum*. وبشكل أساسي فإن هذه الطريقة تشمل ربط GCN4 إلى Wells of microtitre plates بعدئذ يضاف DNA المتكاثرة بطريقة PCR والذي فيه أماكن ارتباط لـ GCN4 مع مجموعة نيوكليوتيدات قصيرة ومجموعة بيوتين مرتبطة مع مجموعة نيوكليوتيدات قصيرة أخرى. الجزء المعرض من البيوتين عندئذ يكتشف عن طريق إضافة Avidin Peroxidase conjugate متبوعاً بكشف البيروكسيداز بمادة تفاعل كروموجيك. هذه الطريقة مذكورة في شكل ٢٦. هناك أبحاثاً مشابهة (جدول ١٥ طريقة ٩) باستعمال أنواع مختلفة من البروتين المرتبط مع DNA مثل Tytr المأخوذ من *E. coli* قد تكلم عنه Triglia et al سنة ١٩٩٠.



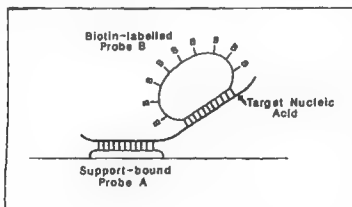
شكل رقم ٢٦ :

الكشف بالدليل اللوني لمنتجات PCR باستعمال DNA ثنائي الشريط مرتبط مع البروتين GCN4. إن DNA المكبر بواسطة PCR مبنى عن طريق ربط GCN4 بمواقع ملائمة بإحدى مجموعة النيوكليوتيدات القصيرة ومجموعة بيوتين مرتبطة مع مجموعة نيوكليوتيدات قصيرة أخرى.

٢ - اكتشاف الحمض النووي الهدف بطريقة ساندوتش هايبريد ايزيشن :

Detection of Target Nucleic Acid by Sandwich Hybridization

بينما طرق مجموعة هجن القواعد المتجانسة ABHC لاكتشاف نواتج PCR المتكاثرة حملت آمالاً لتطبيقها على الفيروسات، إلا أن الباحث يجب أن لا يتغاضى عن الإجراءات المبينة على طريقة Sandwich Hybridization (SH). إن العالم Ranke et al سنة ١٩٨٣ قد أدخل تطويراً أساسياً في مرحلتى هذه الطريقة وذلك للاكتشاف والتقدير الكمي للأحماض النووية في العينات المريضة الخام، باستعمال DNA لفيروس الغدة في الإنسان كنموذج. إن الأساس العام لهذه الطريقة مذكور في شكل ٢٧. باستعمال منقبات DNA أحادى الخيط في الفاج M13 الناقل لـ DNA كمثال. من الضروري أن يكون هناك منقبتين كل منهما يتجهن مع مناطق مختلفة غير متشابهة من الحمض النووي الهدف. يرتبط أحد المنقبتين مع المادة الصلبة الداعمة أو الساندة وهذه تكون مثل نتروسليلوز، Receptal surfaces، Microtitre plate wells، Sephacryl، بينما المنقب الآخر يعلم بالبيوتين مثل الفوتوبويتين. إن الـ DNA المرتبط بالمادة الصلبة الداعمة (المنقب الجاذب) يهجن مع عينات إختبار الحمض النووي في وجود المنقب الثانى المعلم بالبيوتين (المنقب الكاشف) والذي يمكن أن يرتبط فقط مع المادة الصلبة الساندة عن طريق كوبرى أو جسر من الحمض النووي الهدف شكل ٢٧. بعد

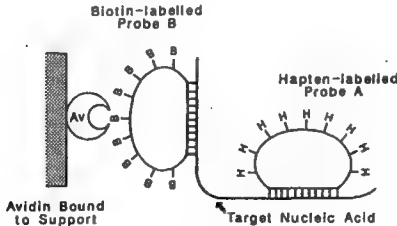


شكل رقم ٢٧ :

شكل تخطيطي يوضح المبادئ الأساسية في مرحلتى التهجين بالسندوتش. يلاحظ المنقبتين كمثال، منقب ذو خيط وحيد من DNA فى الفاج الناقل M13. إحتلالهما مرتبط إلى المادة الصلبة الداعمة A والآخر معلم بالبيوتين B.

إجراءات الغسيل العادية، فإن منقب الكشف المتجمد يقاس بواسطة التفاعل مع أفيدين أو سترتافيدين وأنزيم الربط.

لغاية الآن فإن الباحثين مدركون بأن طوري طريقة SH لم يستعملوا لاكتشاف الفيريدات ولا الفيروسات النباتية، إلا أن Keller et al سنة ١٩٨٩، ١٩٩٠ ذكر إمكانية استعمال إختبار Microtiter Sandwich hybridization في اكتشاف تنابعات التكاثرات العددية في PCR لفيرس نقص المناعة في الإنسان HIV وتنابعات فيرس التهاب الكبد B (HBV) من سيم المريض. في الحالة الأخيرة فإن المنقب الجاذب (المكزون في الفاج M13 DNA الناقل) ارتبط مع Microtitre Wells والمنقب الكاشف (المكزون في الفاج pB₃₂₂ DNA الناقل) قد علم ببيوتين ضوئي Photobiotin. كل منقب قد تجانس مع نصف تنابعات HBV المتكاثر سامحاً بتكوين تركيبة السندوش التي تجمد منقب الكشف المعلم في Microtitre well كان التهجين فقط لمدة ٤ ساعات وبعد الغسيل فإن منقب الكشف المتجمد يقاس باستعمال Tetramethyl benzidine و Streptavidin - Peroxidase.



شكل رقم ٢٨ :

رسم تخطيطي يبين المبادئ الأساسية للطور المفرد في تهجين السندوش يظهر المنقبان هنا. الأول معلم بالبيوتين B والثاني معلم بالهيبتين H ويظهر باسم منقب A أما الأول فهو منقب B.

هناك طريقة بديلة للطورين في الإجراء المتبع في طريقة SH تكون لكل من الحمض النووي الهدف وللمنقبين المهجنين في المحلول. مثل هذا النظام (طور وحيد في طريقه SH) أحدث تحسناً كبيراً في الصفات الحركية، مؤكداً تأثير تحديد معدل السرعة لنظام Solid support - based. إن الخطوة الحرجة في هذه الطريقة هي الفصل الملاحم والمريح وذو الكفاءة العالية للمنقب (الهجن المقصودة من المنقب غير للمهجن قبل اكتشاف الإشارة). هذا يمكن الوصول إليه عن طريق ادمصاص معقد الهجن إلى مادة صلبة سائدة، يكون ذلك متبوعاً بالغسيل الكامل ١٠٠٪ في المثال المذكور في شكل ٢٨ فإن الأفدين المرتبط بالمادة الداعمة يستعمل لادمصاص منقب B المعلم بالبيوتين في معقد الهجن. طريقة الاستخلاص هذه قد تكون بكفاءة حوالي ٣٠٪ فقط. الاكتشاف يكون خلال منقب A المعلم بالهيتين، ويمكن أن يستعمل Antibody - enzyme conjugate.

إن النظام المذكور سابقاً له إمكانية كبيرة في التشخيص الروتيني للفيرودات وفيروسات النبات باستعمال منقبات غير مشعة. مع أن تفاعلات التهجين تكون دقيقة نسبياً فإن مستخلصات النبات وإجراءات الكشف يجب أن تكون سريعة وموثوقة أثناء إجراءاتها.

مراجع خاصة بالفصل الثالث

- 1 - Allison, R., Thompson, C. and Ahlquist, P. 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 1820.
- 2 - Clark, M. F. and Bar - Joseph, M. 1984. Methods in Virology. Academic Press New York.
- 3 - Cooper, J. I. and Edwards, M. L. 1986. Applied Biology, Wellesbourne U. K. 139.
- 4 - Diener, T. O. 1979. Viroids and viroid diseases, John Wiley & Sons, New York.
- 5 - Gould, A. R. and Symons, R. H. 1983. Annu Rev. Phytopathol. 21 : 179.
- 6 - Gross, H. J. et al. 1982. Eur. J. biochem. 121, 249.
- 7 - Harju, L. et al 1990. Mol. Cell. Probes 4, 223.
- 8 - Kemp, d. J. et al 1989. Proc Natl. Acad Sci USA 86, 2423.
- 9 - Keese, P. and Symons, R. H. 1985. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 82, 4582.
- 10 - Keese, P., Visvader, J. E. and Symon, R. H. 1988. Variability of RNA Genom CRC Press, Boca Baton - FL.
- 11 - Koltunow, A. M. and Rezaian, M. A. 1989. Intervirology 30 : 194.
- 12 - Keller, G. H. et al. 1989. Annal Biochemi 177 : 27.
- 13 - ———— , ————. 1990. J. Clin Microbiol. 28 : 1411.

- 14 - Li, R. et al. 1987. *Nucleic Acid Res.* 15 : 5275.
- 15 - Luria, s. E. et al. 1978. *General Virology*. 3rd edition. New York, Wiley. 578p.
- 16 - Lwoff, A. 1981. *Ann. Virol.* 132 E (2) : 121 - 134.
- 17 - Morris, T. J., Wright, N. S. 1975. *Amer. Potato J.* 52 : 57 - 63.
- 18 - Owens, R. A., Diener, T. O. 1981. *Science*. 213.
- 19 - Rathjen, J. P. 1989. B. Sc. (Honours) Thesis, University of Adelaide.
- 20 - Renz, M. and Kurz, C. 1984. *Nucleic Acid Res.* 12 : 3435.
- 21 - Rank, M. et al. 1983. *Gene*, 21 : 77.
- 22 - Sauvaigo, S. et al. 1990. *Nucleic Acid Res.* 18, 3175.
- 23 - Shikata, E. 1990. *New Viroids From Japan. Semi. Virol.*, 1 : 107.
- 24 - Syvanen, A. C. et al. 1988. *Nucleic Acid Res.* 16 : 11327.
- 25 - Triglia, T. et al. 1990. *Nucleic Acid Res.* 18 : 1080.
- 26 - White, B. A., and Bancroft, F. C. 1982. *J. Biol. Chem.*, 279 : 8569.
- 27 - Wilbur, W. J. and Lipman, d. J. 1983. *Proc Natl, Acad. Sci. USA* 80 : 720.

الفصل الرابع

دراسات تطبيقية على الفيروسات

أولاً:- بناء فيروس معدى فى المعمل:

In Vitro Synthesis of an Infectious Viroid

مقدمة :-

الفيروسات هي ممرضات للنبات تتميز عن الفيروسات بغياب الغطاء البروتيني وباحجامها الصغيرة وهي جزيئات من RNA أحادي الخيط دائرية تتكون من بضع مئات من النيوكليوتيدات. أصغر فيروس فيه ٢٤٠ نيوكليوتيد وأكبر فيروس فيه ٣٧٥ نيوكليوتيد (ذكره Steger et al سنة ١٩٩٢ أن هناك فيروس بطول ٦٠٠ نيوكليوتيد، إلا أنه لم يذكر اسم هذا الفيروس ولا وصفه وسيأتى ذكر الخطأ الذى وقع فيه الباحث). لا يوجد أى تجارب أثبتت بأن الفيروس يستطيع أن يشفر لآى بروتين ولا لآى نواتج ترجمة. وبالتالي فإن الباحث يجب أن يفترض أن تناسخ الفيروس ومريضته تعتمد كلية على نظم أنزيمية فى العائل. إن المعلومات الوراثية فى الفيروسات تكون فى تركيب RNA. كذلك فإن للفيروسات المقدرة لأن تخضع لتركيبات خاصة إنتقالية وتستطيع أن تتفاعل مع بعض عوامل خلية العائل.

ملاحظة وقام بهذا البحث مجموعة من العلماء فى استراليا ومجموعة أخرى فى ألمانيا والذى أمدنى بالبحوث مشكوراً الدكتور M.A. Rezaian والدكتور D. Riesner.

إن النموذج الحديث لتناسخ الفيروسيد يفترض ميكانيكية الدائرة الملتفة. يمكن ذكر هذه الميكانيكية باختصار ونقول بأن الفيروسيد الدائري (خيط موجب) ينسخ إلى Oligomeric خيط سالب من RNA. الخيط السالب هذا يعمل كقالب لبناء Oligomeric خيط موجب من RNA. كلتا خطوتى النسخ يحفزانه بواسطة أنزيم العائل RNA Polymerase II المعتمد على DNA. أما الخيط الموجب Oligomeric RNA ينشط أنزيمياً إلى جزيئات ذات وحدة طول والذي بعد ذلك يلتحم ليكون دوائر فيروسيد تامة mature. إن الانشطار الذاتى والالتحام الذاتى لا نستطيع تأكيد صحتها بالرغم من التجارب العديدة. هناك استثناء لهذه العملية موجود فى فيروسيد ضربة الشمس فى الأفوكادو حيث أن جزيئات وحدة الطول تتكون بواسطة الانشطار الذاتى فى ال Oligomers، لا يوجد أنزيم يشارك خلال خطوة البناء هذه. يجب على الباحث أن يفترض بأن الدقة فى قطع ولحم وسيطات التناسخ من ال Oligomeric يكون نتيجة للتحديد الجيد للتركيب الثانوى للموقع. ويجب التأكد من أن الفيروسيدات كجزيئات متطفلة لا تزود العوامل الخاصة بها فى خلية العائل بأى إجراء وأن عوامل التجهيز تلك الخاصة بخلية العائل لا تتكيف مع الفيروسيد. وبالتالي فإنه على نقيض واضح مع بناء RNA العائل فإن التركيب الثانوى للفيروسيدات ووسيطاتها فى التناسخ يكون لها الدور السيادة فى الخلية.

دبابيس الشعر:

إن التركيب والتركيب الانتقالي للفيروسيدات معروف بشئ من التفصيل. تحت الظروف الطبيعية فإن الفيروسيدات تشكل تركيب شبه عصوى والذي يمكن وصفه بأنه تركيب متسلسل من حلزونات قصيرة مع عروات داخلية صغيرة. أثناء الدنترة بالحرارة فإن الفيروسيدات تمر بعدة تركيبات إنتقالية من التركيب شبه العصوى إلى دائرة أحادية الخيط بدون أية أزواج قواعد بين الجزيء. فى الاتحادات العالية الانتقالية الرئيسية فإن جميع أزواج القواعد للتركيب الطبيعى تتعطل وتنفصل ويتكون تركيب واضح جديد ثابت يسمى دبوس الشعر، وهى ثلاثة دبابيس،

دبوس الشعر I، II، III. هذا التحول يمكن رؤيته كسوط ذو تركيب ممتد إلى متفرع مع فقد واضح في تزاوج القواعد. أما على درجات الحرارة الأعلى فإن دبايس العشر الثابتة تنفصل باستقلالية عن بعضها البعض حسب درجة ثباتها في الحرارة. إن دبوس الشعر I و II تكون أكثر ثباتاً وحفظاً بين الفيرويدات المختلفة أكثر من بقية الجزئ مع الأخذ بعين الاعتبار موقع، طول ومحتوى القواعد C + G. أما دبوس الشعر رقم III فإنه يوجد فقط في الفيرويد PSTVd وبالتالي فإن أهميته جانبية.

لقد درس حديثاً العلاقة الوظيفية لدبوس الشعر II عن طريق الموقع المباشر للطفرات وطرق ال Thermodynamic واختبارات الحيوية بواسطة Loss et al سنة ١٩٩١. ولقد تبين أن دبوس الشعر II يتكون ليس فقط خلال الدنترة بالحرارة للفيرويدات الدائرية ولكن يمكن أن يتكون خلال بناء وسيطات تناسخ الفيرويد، ومن المحتمل أن تكون هذه الخطوة أكثر أهمية من ناحية بيولوجية حيث أنه يكون جزء من التركيب شبه المستقر. أظهرت الدراسة المستفيضة أن الطفرات التي تحدث في القطع التي تشكل دبوس الشعر II واختبارات الحيوية مع cDNA للفيرويد المتحول أن المنطقة المركزية لساق دبوس الشعر II هي المنطقة الحرجة في تناسخ الفيرويد. ولدى الأخذ بعين الاعتبار المعلومات الوازة في كثير من المراجع على مواقع الارتباط لكثير من عوامل النسخ، هذه الأبحاث تشير إلى الفرضية بأن دبوس الشعر II يعمل كموقع ارتباط لعوامل النسخ في خلية العائل.

هناك كثير من التقارير في المراجع تدل على أن المنطقة المحتوية دبوس الشعر I يمكن أن تكون موجودة في بناء ال Oligomeric وسيطات للتناسخ. يتكون دبوس الشعر I في منطقة من الجزئ التي تظهر تماثل تتابع قوى بين كل الفيرويدات من مجموعة PSTVd هذه القطعة تسمى -Upper central con- (UCCR) served Region. في حالة PSTVd لقد ذكر حديثاً أن RNase T₁ يكون قادراً ليحفز في لمعمل كلاً من تفاعل القطع واللحم بدون الحاجة إلى أى بروتين

آخره Tsagris et al سنة ١٩٩١. وكمعليلات فرضية لتفاعل الجهاز، فإن دخول أنزيمات مشابهة يمكن تخيلها ضمن خلية النبات. زيادة على ذلك نظراً لأن PSTVd يمثل في كثير من الاعتبارات على أنه صف Class كبير من الفيرويدات، فإن المقدرة على الجهاز بواسطة RNase T₁ يمكن أيضاً أن يلزم للفيرويدات الأخرى. لمثل هذه الدراسة فإن العالم السابق ذكره استعمل نسخة مستقيمة أطول من وحدة الطول (٨٥ نيوكليتيده إلى ٣٥٩ لكل واحد إلى ١٠٦ بإضافة ١٢ نيوكليتيده على النهاية 5' وإضافة ١٣ نيوكليتيده على النهاية 3')، وبالتالي فإن النسخة تحتوي على الجزء المركزي من UCCR بمقدار الضعف، على النهاية 5' ونهاية 3'. إن أربعة من 5'-vector النيوكليتيدهات المجاورة للتتابع النوعي لـ PSTVd تكون متماثلة لتتابع G80 PSTVd إلى U 83، وبالتالي فقط فإن الـ C84 تكون غائبة من خمسة نيوكليتيدهات أطول في PSTVd المتخصص الممتد على النهاية 5' للنسخة. إن الموقع G80 قد تحدد كموقع للقطع وإعادة اللحام في نسخة RNA ذو الخيط الموجب بواسطة RNase T₁. نظراً لأن هذه النسخة غنية بالكثير من مواقع G التي عليها apriori قطع ولحام يمكن أن يؤدي إلى دوائر مضبوطة من PSTVd، ولكن التفاعل الكامل كان ملاحظاً فقط على G80. من هذا يمكن الاستنتاج بأن التفاعل يكون موجهاً بواسطة تركيب ثانوي خاص للنسخ.

بناء فيرويد CEVd في المعمل:

لقد استعملت كلونات cDNA الفيريودية المعدية على نطاق واسع للدراسة التتابع المطلوب لتضاعف ومرضية الفيريود بواسطة طريقة Site Directed mutagenesis. كما وأن حيوية كلونات DNA ونسخها الخاصة تعتمد على وجود تتابع في فيرويد أطول من وحدة الطول في تركيبات الـ DNA. بعض كلونات الـ Monomeric أيضاً تكون معدية كنتيجة لتزامن وجود تتابعات الفيريود في

الجزيئات الناقلة والتي تؤدي إلى تكوين أطول من وحدة الطول لـ cDNAs. تحتوي تخضيرات الفيروس من النباتات على نسبة من الجزيئات في شكل مستقيم والذي يكون عالي الحيوية (معدى) ويبدو أنه يحصى على نهايات 2', 3'- cy- phosphate والتي ذكر بأنها ضرورية للحوية (العدوى).

في هذا البحث نذكر طريقة بناء فيروس اكسوكورنر الحمضيات المعدى بنفس الطول في المعمل، لنسخ ال Monomer وفيروس دائري CEVd مولود به دون اللجوء إلى إجراءات الكلونة. تحتوي النسخ المعدية نهايات triphosphate 5'- و 3'- OH وفي هذا البحث أمكن إثبات أن cyclic phosphate 2, 3- ليست خطوة أولية Prerequisite في الحوية.

١ - إكثار وتنقية فيروس CEVd :

تجهز نباتات طماطم *Lycopersicon esculentum* Mill cv. Rutgers في طور النمو الفلقى وتحقن ميكانيكياً بسلالة شديدة من فيروس CEVd وتحفظ على درجة حرارة ٢٧ - ٣٠ م كما في الطريقة التي ذكرها Rezaian et al سنة ١٩٨٩. بعد ظهور الأعراض يؤخذ مستخلص الفيروس من النباتات (حسب طريقة Rezaian سنة ١٩٩٠) وينقى ذلك بواسطة الكروماتوغرافى السيلولوزية ثم يتبع ذلك طريقة الهجرة الكهربائية فى الجيل ثنائية الاتجاه كما ذكرها Rezaian سنة ١٩٨٩.

٢ - بناء cDNA :

يتم بناء cDNAs ثنائية الخيط بواسطة عملية النسخ العكسى الموحدة Combined reverse transcription ويجرى عملية إكثار amplification باستعمال CEVd نقى كقالب وإن واحداً من الزوجين المختلفين من Oligonucleotide المصنعة تستعمل كقالب شكل ٢٩. بنى مجموعة النيوكليوتيدات القصيرة Oligonucleotides باستعمال طريقة Applied Biosystems 391 DNA Synthesizer وتنقى على لفائف OPC حيث أنها تصمم بطريقة معينة.

يلزم فى هذه العملية ستة بوائى primers ويرمز لها P_1, P_2, P_3 وتركيبها كالآتى :-



وهناك P_5, P_6 سنذكرها فيما بعد.

يتكامل P_1 مع P_3 حيث أن مركز 38 مع 69 فى (P_1) و 300 مع 330 (P_3) شكل (٢٩) من CEVd-A. أما P_2 و P_4 تشتمل T_7 RNA polymerase محفز residues 1-18 وتتابعات CEVd ذات المعنى Sense متوافقة مع residues 70 (P_2) و 86 و P_4 331-346 من هذا الفيروس (شكل ٢٩). إن G ذات الموقع ١٨ المكتوبة بخط أسود غامق فى الشكل هى فى هذه البوائى مشتركة للقطعتين ومتوافقة مع الموقع ٧٠ فى P_2 أو ٣٣١ فى P_4 فى جزئ CEVd.

يؤخذ ٥٠ نانوغرام من CEVd-A وتمزج مع ١٠٠ ضعف مولر زيادة لكل من هذه البوائى المنتقاة وتسخن على ٨٥ م لمدة ٢ دقيقة. بعد ذلك يجرى عملية نسخ عكسى مرتبط وإكثار عددي فى ٥٠ ميكولتر تشتمل القالب والبوائى، ١٠ ملى مول Tris-Hcl (على درجة حرارة الغرفة العادية ٢٥ م ورقم حموضة ٨.٣)، ٥٠ ملى ملى KCl، ٢ ملى ملى $MgCl_2$ ، ١٠ ميكو غرام / مللتر جلاتين، ٢٠٠ ميكرومول لكل dNTP، وحلتين AMV من أنزيم النسخ العكسى Promega، ووحدة واحدة من أنزيم Taq DNA Ploymerase (Promega) يحضن الخليط على ٤٢ م لمدة ١٥ دقيقة يتبع ذلك ٣٠ دورة PCR على جدول مقسم حسب الآتى: ١ دقيقة على ٩٤ م، ٢ دقيقة على ٥٥ م، ٣ دقيقة على ٧٢ م. إن

ال DNA الذى ازداد عدده عومل بأنزيم RNase (١٠ ميكوغرام / مل على ٣٧م لمدة ٣٠ دقيقة) وتنقى بواسطة الهجرة الكهربائية فى أجروس منخفض نقطة الذوبان.

٣ - النسخ فى المعمل In Vitro transcription :

يحضر قالب DNA (١٠٠ نانوغرام) وينسخ بأنزيم T₇ RNA Polymerase بشكل أساسى كما هو مذكور فى طريقة Melton et al سنة ١٩٨٤. بالإضافة إلى القالب فإن التفاعلات تشتمل ٠,٥ مللى مول لكل rNTP و ٤٠ مللى مول - Tris pH 7.6 HCl و ٦ مللى مول كلوريد مغنيسيوم و ٠,١ ميكوغرام لكل ميكولتر أسيتيليد BSA (Promega)، ٥ مللى مول DTT و ٠,٢ وحدة ميكوغرام لكل ميكولتر أنزيم T₇ RNA Polymerase فى حجم كلى من ١٠٠ ميكولتر. يتبع ذلك التحضين على درجة ٣٧م لمدة ٣٠ دقيقة. الخفيلط المنسوخة تستعمل إما مباشرة للحقن أو تعامل بـ ٠,١ وحدة لكل ميكولتر RNase - Free DNase أو مائة ميكوغرام لكل ملتر RNase - Free DNase على درجة حرارة ٣٧م لمدة عشرة دقائق قبل الحقن. تختبر مهضومات النيوكلييز بواسطة عينات Electrophoresing لكل مخلوط تفاعل على Polyacrylamide gel مدنتر ٦٪ محتويًا ٨ مول يوريا يتبع ذلك الصبغ بالفضة. تكون النسخ المعدة للاستعمال فى نهاية تفاعلات التكيف (التعديل) قد استخلصت بالفينول وأجرى لها ترسيب بالايثانول قبل المعاملات الأخرى.

٤ - تحويل خمسة فتحة الطرفية وتحليق نسخ RNA :

Modification of 5'- termini and Circularization of RNA transcripts.

إن جزيئات RNA المنتجة بواسطة النسخ فى المعمل تحتوى نهايات 5'- triphos- OH و 3'- OH. إن النهايات 5'- triphosphate بجرى لها تحويل لتصبح 5'- OH وذلك عن طريق تحضين حوالى ١٠٠ نانوغرام من RNA مع وحدة واحدة من

أنزيم RNase Calf intestinal phosphatase يتبع ذلك الاستخلاص بالفينول ثم الترسيب بالاثانول. لقد أنتجت نهايات Monophosphate $5'$ - باستخدام نسخ مستقيمة مزالة عنها الفسفرة و ATP غير مشبعة وأنزيم Polynucleotide Kinase. يستعمل تفاعل متوازي مع ATP - [^{32}P] لدمج Monitor phosphate. أما بالنسبة للتخليق فإن RNA المعامل بالكينيز يسخن على درجة 65° م لمدة ١٠ دقائق لتثبيط الكينيز ثم بعد ذلك يحضن مع T₄ RNA ligase.

٥ - تحديد التتابع في نقط اتصال الربط في الطبيعة:

Determination of The Sequence of The In Vivo Ligation Junction.

تعزل الفيرويدات الذرية (Progeny) من نسيج مصاب بنسخة مستقيمة من CEVd أنتجت باستخدام البوادي P₁ و P₂ (CEVd - T₁) كما ذكر سابقاً وأجرى لها إكثار بواسطة النسخ العكسي / PCR باستخدام P₅ و P₆ وتركيبهما كالآتي.



$[dCTGCTGGCTCCACATCCGA] = P_6$ تكون مرتبطة مع نيوكليوتيدات ١٧٥ إلى ١٩٨ ، ونيوكليوتيدات ١٩٩ إلى ٢١٧ من CEVd بالترتيب شكل ٢٩. إن ال DNA الذى حصل له إكثار أجرى له عملية تنقية بالهجرة الكهربائية فى أجروس ذو نقطة ذوبان منخفضة وحصل له تسلسل مباشرة بواسطة DNA T₇ polymerase (Bachmann et al سنة ١٩٩٠).

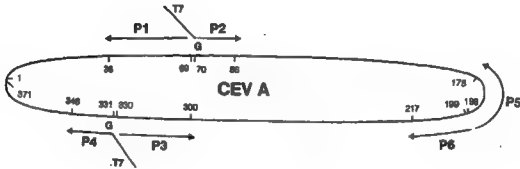
النتائج Results:

١ - توضيح لبناء الفيرويدات فى المعمل:

Scheme For The In Vitro Synthesis of Viroids

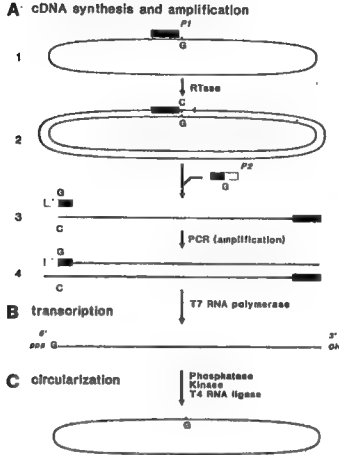
الخط الأول البادئ Oligo deoxy ribonucleotide (شكل ٣٠ P₁) يختار من أى منطقة من الفيرويد $5'$ إلى آخر قاعدة G ويعاد إتحاده إلى RNA الفيرويدي. يؤدي النسخ العكسي إلى طول كامل من cDNA يحوى نهايات $3'$ فى C. الخط

البادئ الثاني (شكل ٣٠، P_2) يحتوى على ال ١٨ نيوكليتيده من T_7 يحفز البناء فى مواقع بدء العمل وترتبط مع تتابع حوالى ١٥ نيوكليتيده مكمله لنهاية 3' من ال cDNA. النهاية G فى موقع ١٨ فى P_2 تشبك أو تربط القطعتين وتكون مكمله إلى C-3' من الخيط الأول من DNA. بناء الخيط الثانى وإكثار ال DNA يتحصل عليه بواسطة طريقة PCR. إن ds DNA المتحصل عليه يحتوى على محفز كامل من T_7 RNA polymerase وتشفر لتتابع الفيرويد بالطول المضبوط. يتم نسخ ال DNA بواسطة T_7 RNA polymerase وينتج فيرويد مستقيم كامل الطول. إن RNA المستقيم يمكن أن يتخلق بواسطة أنزيم الربط RNA ligase بعد أن يحدث تحورات فى 5'- triphosphate إلى Monophosphate.



شكل رقم ٢٩:

مواقع برايمرز متخصصة تستعمل فى تفاعل cDNA / PCR وتتابع ذرية CEVd. برايمر P_1 و P_3 و P_5 متكاملة ذات معنى أما برايمر P_2 ، P_4 و P_6 كانت ذات معنى مع الفيرويد. برايمر P_2 و P_4 تحتوى بروتوموتر بولى ميريذ T_7 RNA. أما برايمر P_5 و P_6 كانت تستعمل للإكثار وتتابع ذرية RNA الفيرويدى. رؤوس الأسهم تشير إلى إتجاه البناء.



شكل رقم ٣٠ :

شكل تخطيطي لبناء الفيريدات في المعمل. (A) بناء cDNA يجرى عن طريق إعادة الاتحاد مع برايمر P₁ بقلب الفيريد الدائري (خطوة ١) يتبع ذلك نسخ عكسي مؤدياً إلى جزئاً منتهياً بنهاية C (خطوة ٢). أما البرايمر P₂، خطوة (٣) يحتوي مشجع T₇ ويستعمل للإكثار في تفاعل PCR (خطوة ٤). النسخ B والتخليق C مشروحة في الكتاب.

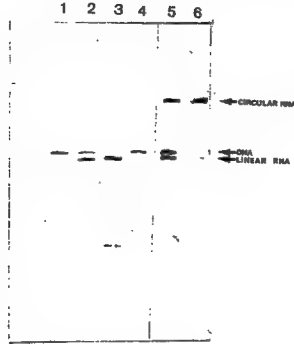
٢ - بناء الأشكال المستقيمة والدائرية من فيروس أكسوكورتز الحمضيات:

Synthesis of Linear and Circular Forms of CEVd

لقد تم بناء فيروس أكسوكورتز الحمضيات في المعمل وظهرت بوضوح نشاطاته الحيوية في تجارب على النبات العائل. إن الفيروس CEVd-A هو خيط مزدوج من cDNA مندمج مع المحفز T_7 قد أنتج (شكل ٣١ شريحة ١) بواسطة عملية النسخ العكسي / PCR وإجراءات استعمل فيها البوادي P_1 و P_2 شكل ٢٩. إن ds DNA قد عومل بأنزيم Ribonuclease لاستبعاد أى بقايا. يستعمل CEVd بشكل أساسى كقالب وبعد التنقية ينسخ بواسطة T_7 RNA Polymerase لإنتاج منتج من RNA وحيد الخيط مساوياً لجزئ مستقيم من CEVd-A بنهايات تصل حتى رقم ٦٩ و ٧٠ (شكل ٣١ شريحة ٢، T_1 -CEVd). إن هوية نسخة من CEVd T_1 قد تأكدت بواسطة الهضم بأنزيمات DNase و RNase (شكل ٣١ شريحة ٣ و ٤). يتبع ذلك الهجرة الكهربائية تحت ظروف الدنترة، إن نسخة من T_1 -CEVd لها نفس القابلية للتحرك والانتقال كما فى A-CEVd المستقيم ذو العدد ٣٧١ نيوكليوتيدة (شكل ٣١ شريحة ٣، ٦) موجود فى تخضير منقى من الفيروس من نباتات مصابة.

النسخ الدائرية المقفولة التكافؤية قد أنتجت من T_1 RNA CEVd المستقيم المتحصل عليه ثم يتبع بعد ذلك إنقلاب للنهاية triphosphate-5 إلى مونوفوسفيت عن طريق المعاملة أولاً بأنزيم الفسفاتيز ثم بعد ذلك بأنزيم Polynucleotide Kinase بعد التحضين مع T_4 RNA ligase فإن نسبة من النسخ المستقيمة كانت قد تخلقت وكانت متساوية فى الحركة مع A-CEVd (شكل ٣١ شريحة ٥، ٦).

إن البوادي P_3 و P_4 شكل ٢٩ كانت قد استعملت فى تفاعل موازى لإنتاج أنواع أخرى من CEVd المستقيم بنهايات على ٣٣٠ و ٣٣١. هذه النسخة الثانية كانت قد استعملت لإختبار إمكانية الإنتاج لهذا التكنيك ولفحص النسخ المبتدأة من مواضع مختلفة على جزئ CEVd الدائري فيما إذا كانت معدية (حيوية).



شكل رقم ٣١:

بناء أشكال الفيرويد CEVd المستقيمة والدائرية. الشريحة ١ = ناتجة عن طريقة التكبير بواسطة PCR للحمض cDNA الفيرويدي CEVd بحوى مشجع T_7 ، أما شريحة ٢ = ناتجة عن إكثار DNA و RNA المستقيم بعد النسخ. شريحة ٣ = ناتجات النسخ معاملة بـ DNase. أما شريحة ٤ = ناتجات نسخ معاملة بأنزيم RNase. شريحة ٥ = ناتجات إزالة الفسفات. نسخ Kinased الناتج معاملة T_4 RNA ligase، شريحة ٦ = CEVd - A مأخوذة ثانية من النباتات المصابة. النسخ الصغيرة تكون غالباً نتيجة نهايات غير ناضجة.

٣ - حيوية فيرويد أكسوكورنر الحمضيات المصنع فى المعمل:

Infectivity of In Vitro Synthesized CENd

بعد حقن نباتات الطماطم بحوالى ٣٠ نانوغرام / ميكولتر من كلا النوعين (نسخة مستقيمة) $CEVd - T_2$ و $CEVd - T_1$ ، فقد أظهرت تشوه كبير فى ساق النبات وتقرم يدل على الإصابة بالفيرويد CEVd - A خلال ثلاثة أسابيع من الحقن (جدول ١٦). لم تتأثر الحيوية بمعاملة مخلوط النسخ بأنزيم DNase ولكن تبطل الحيوية بالمعاملة بأنزيم RNase. إن نباتات الطماطم التى حقنت بكمية أكبر

من ميكوغرام / ميكولتر من قالب CEVd DNA لم يظهر عليها أية أعراض، هذا يدل على أن الحيوية كانت بسبب النسخة الكاملة لـ RNA.

أعيد اكتشاف ذرية الفيروس من نباتات الطماطم المحقونة بنسخة CEVd - T₁ وأثبت أنها دائرية بواسطة الهجرة الكهربائية في الجيل ثنائي الاتجاه. إن تحليل التسابع لذرية الفيروس أثبت أنها كانت مماثلة للفيروس الأصلي في منطقة إتصال الربط في تجارب المحمل.

جدول رقم ١٦: حيوية فيروس إسكويرز الحمضيات المبنى في المعدل:

الحويبة							للحوض النووي الأولى والتركيز		الملاح
5-10	4-10	3-10	2-10	1-10	0-10	0-10	RNA	DNA	
					0/6	0/6	—	1000	CEVd - T ₁ PCR DNA
					0/6	0/6	—	1000	CEVd - T ₂ PCR DNA
					0/6	0/6	30	1	Untreated - CEVd - T ₁
					0/6	0/6	30	0	DNase + Transcription
					0/6	0/6	0	1	RNase + Mixture
					0/6	0/6	30	1	Untreated - CEVd - T ₂
					0/6	0/6	30	0	DNase + Transcription
					0/6	0/6	0	1	RNase + Mixture
0/6	0/6	0/6	0/6	3/6	6/6	0/6	30	0	5'- Endmodified Triphosphate
0/6	0/6	0/6	1/6	4/6	6/6	0/6	30	0	CEVd - T ₁ RNA Monophosphate
0/6	0/6	0/6	0/6	4/6	5/6	0/6	30	0	Transcript Hydroxyl
0/6	2/6	5/6	6/6	6/6	N.T	0/6	30	—	CEVd - A
					0/6	0/6	—	—	T ₁ buffer

ملاحظات:-

التركيز في ميكوغرام / ميكولتر. N.T. = لم يتغير. الحويبة = عدد البلائغ التي تظهر أعراض / عدد البلائغ المختبرة.

٤ - تأثير تحويل النهاية الطرفية خمسة فتحة على حيوية النسخة المستقيمة :

Effect of 5' - terminal modification on Linear Transcript Infectivity

أن تأثير التحويل فى النهاية الطرفية 5' على حيوية نسخة CEVd - T₁ إختبرت بواسطة إنتاج نسخ تحتوى نهايات OH - 3' مرتبطة مع triphosphate 5' أو monophosphate أو مجموعة OH - وأنجزت إختبارات الحيوية بواسطة سلسلة تخفيفات.

التركيز الأولي للنسخ والفيروس ١٠^{-٥} استعملت للدراسة الحيوية كانت ٣٠ نانوغرام لكل ميكولتر وتخفيفات حضرت لغاية ١٠^{-٥}. حقنت النباتات بتركيز ١ ميكولتر من اللقاح لكل فلكة وتركنت لتنمو ثم أخذت عنها الملاحظات.

وجد أن CEVd - A الدائرى النوع الأصلى له نقطة تخفيف قصوى للاحتفاظ بحيويته وكفاءته هي ١٠^{-٥}. وعلى أية حال فإن النسخ المستقيمة كانت فعلاً أقل حيوية حيث تبدى نقطة تخفيف ١٠^{-٣} لـ RNA المستقيم المحتوى 5' - monophosphate و ١٠^{-٢} لـ RNAs المستقيمة التى تحتوى 5' - triphosphate أو OH - 5' (جدول ١٦).

مناقشة النتائج

فى البحوث المذكورة سابقاً ذكر أنه تم بناء نسخاً معدية مستقيمة مختلفة لها الطول الكامل ومتوافقة مع CEVd (الحمض RNA)، كل من هذه النسخ تسبب أعراض مرضية فى نباتات الطماطم نموذجية للعزلة الشديدة من CEVd وتؤدي إلى إنتاج ذرية CEVd دائرية تشبه الطراز الأصلى. إن الدراسات السابقة للأشكال المستقيمة من الفيروسات قد استعملت الفيروسات المستقيمة التى نتجت إما بالحدوث الطبيعى لجزئ مستقيم عزل من نسيج مصاب أو RNA فيروسى دائرى حدث له استقامة بواسطة فعل أنزيمات Nucleases أو أيونات Mg²⁺. إن التحضير لهذا النوع يمكن أن يحصل له تلوث بواسطة RNA الدائرى ويصبح محتويًا على

خليط غير متجانس من جزيئات غير مستقيمة أنتجت بواسطة أحداث الثغرة أو Nicking (إحداث فتحة صغيرة في خيط الحمض النووي) على مواقع مختلفة في الجزيء الدائري وبالتالي يصعب تفسير نتائج الاختبارات الحيوية.

إن الطريقة المذكورة في هذا البحث تغلب على هذه المشاكل وتؤدي إلى إنتاج تخضيرات متجانسة من جزيئات فيروس مستقيمة مساوية لتلك المنتجة بواسطة طريقة الثغرة المفردة على مواضع متخصصة خالية من التلوث بـ RNA الدائري. هذه الجزيئات تكون مناسبة جداً (مثالية) لدراسة حيوية الفيروسات المستقيمة وتأثيرات تحورات النهايات الطرفية على حيوية الفيروس المستقيم.

إن الأشكال المستقيمة الحادثة طبيعياً للفيروسات تتجمع في النسيج المصاب، من المحتمل أن تكون كوسيطات تظهر في نموذج التكاثر (النسخ) بطريقة الدائرة المتلفة. بغض النظر عن الأبحاث السابقة، فإن جميع الدراسات قد أظهرت أن هذه الجزيئات المستقيمة الحادثة طبيعياً أنها معدية. إن الأشكال المستقيمة التي تحدث طبيعياً لفيروس تقزم الأقحوان وفيروس الدرة المغزلية في البطاطس هي معدية مثلها مثل الأشكال الدائرية الخاصة. بينما الشكل المستقيم لفيروس تقزم الأقحوان قد ذكر بأنه ناتجاً عن الانشطار العشوائي، وأن فيروس الدرة المغزلية في البطاطس يبدو بأنه ناتج بواسطة الانشطار الذي يحدث في بضع مواقع خاصة. إن هذه الجزيئات المستقيمة لفيروس PSTVd قد وصفت وذكر لها سميات أكثر وتبين بأنها تحتوي نهايات طرفية 5'-OH و 3'-cyclic phosphate. إن التجمعات غير المتجانسة من جزيئات فيروس PSTVd التي أحدثت فيها ثغرة صناعية (nicked) المنتجة باستعمال Nucleases و U_2 والتي أيضاً تحتوي نهايات طرفية 5'-OH و 2'-phosphate و 3'-cyclic phosphate، قد تبين أيضاً أنها تظهر حيوية كاملة، بينما الجزيئات المشابهة والتي تحتوي نهاية 3'-OH و 5'-phosphate المنتجة بواسطة الثغرة مع S1 nuclease فإنها تعتبر غير معدية. هذه البيانات تقترح بأن حلقة 2', 3'-cyclic phosphate هي خطوة أولية أساسية للحوية (العدوى). وعلى أية حال فإن نتائج

هذا البحث على فيرويد اكسوكورتز الحمضيات لم تدعم هذه الفكرة (النظرية) بسبب أن النسخ المستعملة في هذه الدراسة كلها تحتوي 3^{\prime} -OH وكانت معدية ولو على كميات صغيرة بالمقارنة مع الفيرويد الدائري.

جزيئات فيرويد PSTVd والتي أجري لها عملية الثفرة صناعياً nicked باستعمال Mg^{2+} لانتاج أشكال مستقيمة مع مخلوط من نهايات 2^{\prime} - و 3^{\prime} - phosphate مقترنة مع 5^{\prime} -OH أظهرت بأنها ذات حيوية خاصة منخفضة بأضعاف $10^3 - 10^4$ أو أقل منه في الفيرويد الدائري مشابهة بذلك لحيوية الجزيئات المستقيمة المذكورة هنا. يبدو من المحتمل أن أطراف 2^{\prime} - 3^{\prime} Cyclic Phosphate يجب أن تكون موجودة في ال RNA المستقيم ليظهر حيوية كاملة، ولأن الجزيئات تحتوي مجموعات أخرى على 3^{\prime} - terminus دائماً يبدو بأنها تظهر مستوى منخفض من الحيوية. إن التحوير أو التعديل في ال 5^{\prime} - End يظهر بأن له قليلاً أو بدون تأثير على حيوية النسخ المستقيمة عند مقارنته بالفيرويد الدائري.

هناك نوع جديد ذو حيوية من RNA ligase في مستخلصات جنين القمح والذي يتطلب أطراف 2^{\prime} , 3^{\prime} - cyclic phosphate، وأيضاً 5^{\prime} - phosphate أو 5^{\prime} -OH قد تم وصفه ولقد استخدم في المعمل مثل Viroid ligase. ولقد تبين أن نسخ CEVd المستقيمة والتي لا تحتوي النهاية الطرفية 2^{\prime} , 3^{\prime} - cyclic phosphate كانت معدية وهذا يؤدي إلى الاعتقاد بأنه إما النوع الثاني من ال ligase يكون موجوداً في العائل النباتي أو أن 3^{\prime} - terminus تخضع لعملية الفسفرة في الطبيعة In Vivo Phosphorylation لانتاج 2^{\prime} , 3^{\prime} - cyclic phosphate والتي يمكن فيما بعد أن تعمل كمادة تفاعل لأنزيم ال Ligase الموصوف سابقاً.

المخطط الثاني يبدو أنه أكثر احتمالاً، ولأن مستخلصات جنين القمح لم تظهر نشاطاً يمكن اكتشافه لأنزيم ال Ligase عندما يحضن مع جزيئات فيرويد مستقيم

أنتجت بواسطة S1 nuclease والذي يمتلك نهاية طرفية OH⁻³ و phosphate⁻⁵ مشابهة لواحدة من النسخ التي أظهرت أنها معدية في هذه الدراسة.

إن الفيروسات لم تظهر أى تشفير للبروتينات وتبقى عملية إحداث الطفرات Mutagenesis أكبر طريقة لتحليل وظائف تركيبها. وعلى أية حال فإن دراسة إحداث الطفرات قد تبين بأنها محدودة بسبب الحاجة إلى بناء كلونات DNA معدية فى الشكل head - to - tail dimers وأيضاً بسبب الحاجة لبناء أعداداً كبيرة من الطفرات mutants من التى معظمها يكون غير قابل للحياة. إن نظام بناء ال RNA المذكور فى البحث السابق يتجنب الحاجة إلى كلونة وهو مناسب بشكل خاص لسرعة إحداث الطفرات الموجهة لمواقع معينة - Rapid site - directed mutagenesis فى ال RNA الدائرى بسبب بقاء Oligonucleotide محتوياً طفرات يمكن أن تختار من أى منطقة فى جزئ 5' إلى نهاية موقع G. فمثلاً بالإضافة إلى الفيروسات فإن الفيروسات و Hepatitis delta virus RNA و خمائر RNA replicon 20 S يمكن أن تبنى بواسطة هذا النظام. إن أنظمة بناء RNA داخلياً فى بواقي Oligonucleotide محتوية أنزيم RNA polymerase المعتمد على DNA محفزاً للتتابع قد استعمل قبل ذلك لتكاثر RNA من قالب DNA مكلون أو لإنتاج RNA فيروسى معدى محتوياً إضافة لذلك نيوكليوتيدات 3'-terminal من DNA PCR مكلون. كذلك فإن النظام المذكور هنا فإنه لا يتدخل فى إجراءات كلونة ويؤهل البناء فى المعمل للحجم المضبوط لـ RNAs ليس فقط من قوالب RNA الدائرى ولكن أيضاً من RNAs المستقيم المحتوى 5'-terminal G residue. كذلك فإن mRNAs ويمكن أيضاً RNAs الفيروسى أن تصنف فى هذا المخطط، وهذا التكنيك يرتبط مع إجراء غطاء RNA لإنتاج RNAs فيروسى نشيط بيولوجياً، بدون شك سوف يستخدم فى الدراسات على مثل هذه الجزيئات.

ثانياً: - المعالجة بالحرارة المنخفضة ومزرعة القمة المرستيمية لاستبعاد أربعة فيرويدات من النباتات المصابة:

A Low Temperature Therapy and Meristem - Tip Culture For Eliminating Four Viroids From Infected Plants

مقدمة:

إن الجمع بين المعالجة الحرارية ومزارع القمة المرستيمية قد استعمل منذ مدة طويلة كطريقة للتخلص من الفيروسات من النباتات المصابة، ولكن ثبت بأنها غير فعالة إلى حد ما في التخلص من فيرويد الدرنه المغزلية في البطاطس والتخلص من فيرويد تقزم الأقحوان من النباتات المصابة بالفيرويد في البطاطس والأقحوان. هذا لا يشير الدهشة إذا علمنا جيداً أن الفيرويدات تخترق الخلايا المرستيمية بسهولة أكثر من الفيروسات وأن درجات الحرارة العالية تناسب تناسخ الفيرويد. عندئذ فإن المحاولات لاستبعاد الفيرويدات من النباتات المصابة عن طريق المعالجة بالحرارة المنخفضة مرتبطة مع مزارع القمة المرستيمية يبدو أنها ممكنة. وفي الحقيقة أمكن الحصول على نباتات بطاطس خالية من فيرويد الدرنه المغزلية وكذلك نباتات حشيشة الدينار (HOP) خالية من فيرويد تقزم حشيشة الدينار قد تم بناء على استعمال هذه الطريقة:

تؤخذ نباتات بطاطس الصنف المزروع Prosna من عقل ساق أو درنات ثم تخضع بسلالات شديدة من فيرويد الدرنه المغزلية في البطاطس (s - PSTVd)، بالإضافة إلى نباتات الأقحوان الصنف المزروع Bonnie Jean المصابة بفيرويد تقزم الأقحوان CSVd والصنف المزروع Deep Ridge المصاب بفيرويد التبرقش الشاحب في الأقحوان ChCMVd والصنف المزروع Mistletoe المصاب بفيرويد الثمرة الباهتة

ملاحظة: قام بهذا البحث إثنان من العلماء في وارسو (بولندا) والذى أمدنى بالبحث الدكتور E. Paduch

. Cichal

فى الخيار CPFDv وتنمى فى مرأقد نمو على درجة حرارة ٢٥م وإضاءة ١٦ ساعة يومياً مع كثافة ضوئية 5.0001X. أما نباتات الكنترول من نفس الأنواع والأصناف المزروعة والتى أصيبت بنفس الفيرويد نميت فى صوبها زجاجية تحت ظروف نمو قياسية.

درنات بطاطس من الصنف Azalia والصنف Irys المصابة بالسلالة الشديدة من فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس s - PSTVd أو السلالة المعتدلة PSTVd - m تحتفظ فى ثلاجة على درجة حرارة ٦ - ٧م. أما الدرنات الكنترول من نفس الأصناف والتى أصيبت بنفس الفيرويدات حفظت على درجة حرارة الغرفة العادية.

بعد ٣ و ٦ شهور تقطع القمم المرستيمية من السيقان أو نموات الدرنه من النباتات المعاملة والكنترول. تظهر سطوح المواد النباتية عن طريق غمرها فى ٩٦٪ إيثانول لمدة ٣٠ ثانية ثم تشطف بماء معقم. قطعت القمم المستيمية (قبة المرستيم مع واحدة أو إثنين لفة إبتدائية) فى ظروف معقمة بنصل حاد معقم. نقلت القمم المقطوعة على ورق ترشيع يعمل كموصل إلى أنابيب إختبار بايركس (١ سم قطر و ٧ سم طول) وضع فيها ٤ مللتر محلول بيئة يسمى بيئة Murashinge & Skoog (هذه البيئة ذكرها كل من Mellor & Smith سنة ١٩٧٧) والتى كانت قد عقمت مسبقاً لمدة ٣٠ دقيقة فى الاوتوغلوف على ضغط جوى واحد. تغلق أنابيب الإختبار بغطاءات قطنية من نوع صوفى ويقطع من Parafilm وحفظت على دجة حرارة ١٦ - ٢٠م و ١٤ ساعة إضاءة يومياً وكثافة ضوئية 2.0001X.

عندما أصبح طول النباتات النامية من الدرنات بطول ٣سم وعندما تكون لها نظام جذرى جيد نقلت إلى أوعية بلاستيكية صغيرة مملوءة بمخلوط (١:٢) Peat moss ورمل. بعد ١٠ - ١٤ يوم أخرى نقلت إلى أوعية بلاستيكية مملوءة بمواد مناسبة للنمو ثم تركت لتنمو تحت ظروف الصوب الزجاجية المثالية.

إختبر وجود الفيرويد فى النبات بعد ٢، ٤ و٦ شهور من النمو فى الصوباء الزجاجية. النباتات المفردة إختبرت بواسطة الهجرة الكهربائية فى Polyacrylamide gel وبواسطة الإختبارات الحيوية. نباتات الطماطم صنف Rutgers استعملت ككاشف لكل من PSTVd السلالة الشديدة والمعتدلة، نباتات الأقحوان الصنف المزروع Deep Ridge كاشف لـ ChCMVd ونباتات الأقحوان الصنف المزروع Bonnie Jean كاشف لكل من CSVd و CPFVd. هذه الأصناف ثبت وأنها نباتات كاشفة جيدة للفيرويدات فى تجارب سابقة.

النتائج:.

نباتات الأقحوان تحملت ظروف درجات الحرارة المنخفضة والكثافة الضوئية المنخفضة بصفة أحسن من نباتات البطاطس جدول ١٧. كانت أقل درجة تحمل لنباتات البطاطس هى النامية من الدرناات. فقط نبات مفرد واحد من ٢٠ نبات بقيت حية لمدة ٣ شهور تحت هذه الظروف وحتى هذا النبات المفرد مات قبل نهاية الستة شهور مدة المعالجة. أما نباتات البطاطس النامية من عقل ساق بقيت حية لمدة أطول نوعا ما وأربعة نباتات منها بقيت حية حتى نهاية الستة شهور مدة المعالجة. ومن ناحية أخرى فإن درناات البطاطس بقيت حية بصورة جيدة فى ظروف المعالجة والتي كانت غالباً مثل الظروف المثالية لتخزين البطاطس جدول ١٧.

أما بالنسبة للقمم المرستيمية، تقريباً فإن نصفها قد نمت إلى نباتات ولا يوجد مشكلة فيما إذا كانت قد قطعت من نباتات الأقحوان أو البطاطس (جدول ١٧). لم يلاحظ أى تأثير لظروف المعالجة على بقاء المرستيمات حية. إن العدد الحقيقى للقمم المرستيمية التى بقيت حية يختلف من ٢٥ - ٢٩٠ للنباتات المختلفة ولكن يبدو أنها لم تتأثر بنوع النبات ولا بظروف المعالجة جدول ١٧.

إن الأعراض النموذجية للإصابة بالفيرويدات ChMVd، CSVd و CPFVd كانت ملاحظة على نباتات الأقحوان النامية من قمم مرستيمية أخذت من نباتات

الكتترول الجاهزة فى الشهر الأول من نموها فى الصوبا الزجاجية. نباتات البطاطس النامية من قمم مرستيمية المأخوذة من مثل هذه النباتات أظهرت أعراض PSTvd بعد ٢ أو ٣ شهور من نموها فى الصوبا الزجاجية. جميع الفيرويدات الأربعة اكتشفت فى هذه النباتات بواسطة الاختبارات الحيوية أو بواسطة اختبار الهجرة الكهربائية فى Polyacrylamide gel.

ولسوء الحظ فإن الأربعة فيرويدات كلها اكتشفت أيضاً فى جميع النباتات النامية من القمم المرستيمية المأخوذة من النباتات التى قد نمت لمدة ٣ شهور فى ظروف المعالجة. الفيرويدات اكتشفت فى هذه النباتات بعد شهرين من النمو فى الصوبا الزجاجية (جدول ١٨) وبعد شهر أو شهرين جميع هذه النباتات أظهرت أعراض.

ومن ناحية أخرى ولا أى نبات من النباتات النامية من قمم مرستيمية المأخوذة من النباتات التى قد نمت لمدة ٦ شهور فى ظروف درجات حرارة منخفضة لم تظهر أعراض إطلاقاً للإصابة الفيرويدية خلال ستة شهور من النمو فى الصوبا الزجاجية. إن الاختبارات الحيوية واختبارات الهجرة الكهربائية فى Polyacrylamide gel قد أثبتت أنه بعد شهرين من النمو فى الصوبا الزجاجية فإن أعداداً كبيرة من هذه النباتات كانت خالية من الفيرويدات. إعادة الاختبار لهذه النباتات بعد ٤ و ٦ شهور من النمو فى الصوبا الزجاجية أظهرت الوجود للفيرويدات فى بعضها ولكن لا تزال ١٨,٥ - ٢٨,٠ ٪ من هذه النباتات خالية من الفيرويد جدول ١٨.

الدرنات من نباتات البطاطس والمقل من نباتات الأقحوان التى ظهرت بأنها خالية من الفيرويد بعد ٦ شهور نمو فى الصوبا الزجاجية قد نميت إلى نباتات وهذه النباتات أختبرت ثانية لمعرفة وجود الفيرويدات فأعطت نتائج سالبة.

جدول ١٧: حصر لنباتات البطاطس والذرات ونباتات الأكلوان في درجات الحرارة المنخفضة ثم وحصر للنباتات الناتجة من القمم المرسومة لهذه النباتات.

الاجزاء النباتية والقيرويد	المعاملة	عدد النباتات (ذرات)		عدد المرسوبات المنطوقة من النباتات (ذرات) بعد المعالجة		عدد النباتات الناتجة من المرسوبات المنطوقة بعد المعالجة	
		معاملة ثابتة	معاملة متغيرة	٢ شهر	٦ شهر	٢ شهر	٦ شهر
أ- بطاطس نوع Proema - نباتات	معالجة	٢٠	١	٢٠	٢	٢٠	٢
١- ناعية من ذرات	معالجة	٢٠	١	٢٠	٢	٢٠	٢
٢- s - PSTVd	معالجة	٢٠	١	٢٠	٢	٢٠	٢
ب- بطاطس نوع Proema - نباتات	معالجة	٢٠	١	٢٠	٢	٢٠	٢
١- ناعية من عقل	معالجة	٢٠	١	٢٠	٢	٢٠	٢
٢- s - PSTVd	معالجة	٢٠	١	٢٠	٢	٢٠	٢
ج- بطاطس نوع أوليا - ذرات	معالجة	٢٠	١	٢٠	٢	٢٠	٢
s PSTVd	معالجة	٢٠	١	٢٠	٢	٢٠	٢
د- بطاطس نوع ليرس ذرات	معالجة	٢٠	١	٢٠	٢	٢٠	٢
s PSTVd	معالجة	٢٠	١	٢٠	٢	٢٠	٢
هـ- بطاطس نوع أوليا ذرات	معالجة	٢٠	١	٢٠	٢	٢٠	٢
m PSTVd	معالجة	٢٠	١	٢٠	٢	٢٠	٢
و- بطاطس نوع ليرس ذرات	معالجة	٢٠	١	٢٠	٢	٢٠	٢
m PSTVd	معالجة	٢٠	١	٢٠	٢	٢٠	٢
ز- أكلوان نوع صوب رادج	معالجة	١٩	١٩	١٩	١٩	١٩	١٩
CHCMVd	معالجة	١٩	١٩	١٩	١٩	١٩	١٩
ح- أكلوان نوع يون جين	معالجة	٢٥	٢٥	٢٥	٢٥	٢٥	٢٥
CSVd	معالجة	٢٥	٢٥	٢٥	٢٥	٢٥	٢٥
ط- أكلوان صنف مستيليو	معالجة	١٠	١٠	١٠	١٠	١٠	١٠
CPFVd	معالجة	١٠	١٠	١٠	١٠	١٠	١٠

جدول ١٨: كفاءة استبعاد أربعة فيرويدات من نباتات البطاطس والأقحوان باستعمال مزرعة القمعة المرستيمية بعد المعالجة بالحرارة المنخفضة.

عدد النباتات الخالية من الفيرويد اعتماداً على الاختبار بعد فترة نمو في النصبوا الزجاجية			عدد النباتات للنامية من المرستيم المقطوع	مدة المعالجة بالأشهر	المادة النباتية والفيرويد
شهر ٦	شهر ٤	شهر ٢			
—	—	صفر	٢٥	كترول	بطاطس - نباتات الصنف بروسنا
—	—	صفر	٥	٣	نباتات بطاطس نامية من الساق
٦	٨	٩	١١	٦	نباتات بطاطس نامية من عقل للمعاملة بالفيرويد PSTVd - s
—	—	صفر	١٥	كترول	بطاطس - صنف بروسنا نباتات
—	—	صفر	٥	٣	بطاطس صنف ازولا - درنات
١	٢	٢	٤	٦	s - PSTVd
—	—	صفر	٢٢	كترول	بطاطس مزروعة صنف أيرس
—	—	صفر	١٠	٣	بطاطس درنات
٢	٣	٥	٧	٦	s PSTVd
—	—	صفر	٢٦	كترول	بطاطس مزروعة صنف بروسنا
—	—	صفر	١٢	٣	درنات صنف ازولا
٥	٦	٧	١٠	٦	m PSTVd
—	—	صفر	٢١	كترول	بطاطس مزروعة صنف أيرس
—	—	صفر	١٠	٣	بطاطس درنات
٤	٥	٦	٨	٦	m PSTVd
—	—	صفر	٥٤	كترول	الأقحوان
—	—	صفر	٢٨	٣	أقحوان صنف ديب راجد
٢٦	٢٩	٣١	٣٧	٦	فيرويد ChCMVd
—	—	صفر	٥٠	كترول	أقحوان
—	—	صفر	٣٢	٣	أقحوان صنف يون جين
٥	٥	١٥	٢٧	٦	CSVd
—	—	صفر	٤٠	كترول	أقحوان
—	—	صفر	١٠	٣	أقحوان صنف مستلوت
٨	٩	٩	١٠	٦	CPFVd

ثالثاً: - تثبيط إصابة الفيرويد بواسطة تعبيرات RNA مضاد المعنى فى النباتات المحولة وراثياً:

Inhibition of Viroid Infection by Antisense RNA Expression in Transgenic Plants

مقدمة: -

تعتمد هذه الطريقة على بناء جزيئات من RNA متكاملة مع mRNA الناتج من نسخ جين معين، ويطلق على هذا الأخير اسم Sense RNA (ذو معنى) نظراً لأنه يحمل الكودونات التى تتم قراءتها أثناء عملية الترجمة لانتاج بروتين فعال يحتوى على تتابع نوعى من الأحماض الأمينية. ومن جهة أخرى يطلق على النسخة المكاملة من RNA اسم مضاد المعنى "Anti Sense" نظراً لأن تتابع النيوكليوتيدات بها يكون معكوساً بالنسبة للتتابع على النسخة الأصلية مما يترتب عليه عدم إمكان قراءة كودونات شفرية صحيحة وذات معنى بل تقرأ على أنها كودونات إنهاء الترجمة فى أى إطار قراءة من الإطارات الثلاثة.

يؤدى توافر RNA مضاد المعنى مع mRNA المراسل الطبيعى لنفس الجين فى سيتوسول الخلية إلى حدوث تجاذب نوعى بينهما بحيث ينتج جزيء مزدوج هجين من RNA، وينتهى أنه لا يمكن ترجمة مثل هذا الجزيء المزدوج مما يعنى عدم الحصول على الناتج النهائى لتعبير هذا الجين (البروتين) وبالتالي يكون بمقدورنا تحديد وظيفة هذا الجين.

وتتلخص طريقة إنتاج RNA مضاد المعنى لجين ما فى الخلية فى الآتى: -

ملاحظة: قام بهذا البحث أحد عشر عالماً فى مركز أبحاث البيولوجيا الجزيئية فى ألمانيا والذى أمدنى بهذه المعلومات مشكوراً هو الدكتور Detlev Riesner وأنا أعرضه بشكل مختصر.

١ - كلونة الجين المطلوب دراسته.

٢ - فصل التتابع الشفرى للجين عن منطقة البروموتور الخاص به باستخدام أنزيمات القطع المحددة المناسبة.

٣ - إعادة إتحاد التتابع الشفرى للجين مع نفس البروموتور ولكن فى إتجاه معكوس التتابع.

٤ - إعادة إدخال هذا التتابع المعكوس المتحد بالبروموتور. أى الجين المضاد المعنى إلى الخلية المضيفة بإحدى طرق التحول الوراثى.

تكون المحصلة النهائية لهذه العملية هى أن الجين المعكوس التتابع سيتم نسخه إلى نسخ RNA مضاد المعنى، وهذه بدورها عند اصطدامها بالنسخ الطليعية لـ RNA m لنفس الجين (ذو المعنى) تتزاوج معها مكونة جزئ RNA مزدوج لا يمكن ترجمته مما يؤدى إلى توقف إنتاج البروتين الذى يشفر له هذا الجين.

لقد تم استخدام RNA مضاد المعنى فى إيقاف تعبير عدد كبير من الجينات فى كل من غير مميزة النواة ومميزة النواة. بالإضافة إلى استخدامه فى إيقاف تعبير الجينات معروفة الوظيفة فإنه يمكن استخدامه أيضاً فى التعرف على وظيفة الجينات المجهولة الوظيفة. إذ يمكن استخدام RNA مضاد المعنى فى إنتاج طفرات وظيفية بحيث يعطى الشكل المظهرى الطافر للكائن الذى حدثت به هذه العملية ومعلومات هامة عن وظيفة الجين فى الخلية المتأثرة.

ولكى نضمن الحصول على إيقاف تام للتعبير الجينى فإنه إما أن يستخدم بروموتور قوى جداً لدفع عملية نسخ التتابع الشفرى المعكوس أو أن يتم إدخال عدد كبير من نسخ RNA مضاد المعنى إلى الخلية المضيفة.

(هذه المقدمة أخذت من كتاب البيولوجيا الجزيئية للدكتور محمد فتحى عبد الوهاب سنة ١٩٩٣).

استعمال RNA مضاد المعنى مع الفيروسيدات:

معظم التطبيقات التي أجريت باستعمال RNA مضاد المعنى والموجهة مباشرة ضد الجينوم الفيروسي أظهرت نجاحاً محدوداً. هناك تعبيرات أكثر فعالية للإصابة الفيروسية حصل عليها في حالة الفيروس ذو آل DNA، الفيروسات المتجمعة (فيروسات الجوزاء Geminivirus). هذا من المحتمل أن يكون بسبب موقع التناسخ والتجمع للفيروس، فإن الفيروسات المتجمعة تكون في الأنوية بينما مع الفيروسات ذات RNA النبائية تكون موجودة في السيتوبلازم، وبالتالي فإن تضاعف الفيروسات المتجمعة وتناسخ RNA مضاد المعنى Antisense تحدث في نفس الموضع والذي يكون أكثر ملائمة لتكوين معقدات من مضاد المعنى وتتابعات الهدف، عند مقارنتها مع مواقع الفيروسات ذات RNA ومتطلباتها لنقل نسخ مضاد المعنى من النواة إلى السيتوبلازم وما يتبع ذلك من وقف للتناسخ.

هذه الحقائق تدعم فكرة أن الإصابة الفيروسية أيضاً يمكن تثبيطها بكفاءة بواسطة RNA مضاد المعنى antisense بسبب موقعها في النواة. إن عدم وجود دليل لأي ناتج مترجم للفيروسيدات وعدم وجود غطاء بروتيني، فإن جميع النشاطات الأنزيمية والوقاية ضد التحطيم وتجهيز وتخزين الفيرويد يجب أن تتم بواسطة العائل وأن المعلومات الوراثية لـ RNA الفيرويدي لا يمكن أن تكون التتابع للبروتين ولكن يجب أن تكون لتركيبه الخاص.

من المفترض أن معظم الفيروسيدات تناسخ بسلوك غير متماثل شاملة ميكانيكية الدائرة الملتفة لانتاج أشكال Sense RNA Oligomeric - minus والتي تعمل كقوالب لـ Oligomers of plus - sense polarity والأخيرة تجهز فيروسيدات جديدة (خلفه) ذات وحدة طول وبالتحديد plus - polarity. وبالتالي فإن RNA مضاد المعنى يستطيع، في الأصل أن يتوجه إما ضد ذرية الفيرويد monomeric أو الوسيطات الموجبة ذات المعنى Plus - Sense intermediates بالإضافة إلى أنه يوجه ضد تناسخ الوسيطات Minus - Sense Oligomeric. إنه من غير

الممكن استعمال نسخاً Complete monomeric Copies من cDNA الفيرويدي لـ RNA مضاد المعنى الهدف فى الطبيعة بسبب الطول الكامل لمكملات RNAs التى توجد كوسيطات تناسخ فى التواء بأية طريقة كانت ولا تشكل بسهولة ds RNA فى المعمل. زيادة على ذلك فإن التحول مع مثل cDNA الفيرويدي يمكن أن تحفز الإصابة فى النباتات المحوّلة.

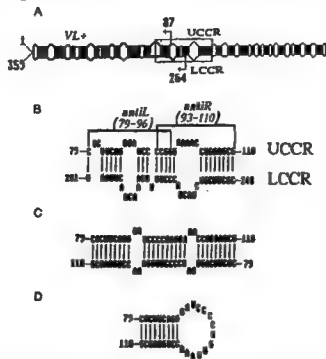
نظراً لأن التركيب والمقاطع التركيبية لـ RNA الفيرويدي كلها معروفة جيداً وهناك نماذج مفصلة موجودة وتوضح شمولها على حوافز تركيبية Structural motifs وخطوات وظيفية مثل التناسخ، التجهيز وغيرها.

فى الجزء الأول من هذه الدراسة كان هناك محاولة لتوجيه RNA مضاد المعنى ضد حافز تركيبى خاص Special Structural motif. إن المنطقة المركزية المحفوظة Central conserved Region (CCR) الذى حدد تتبعها أولاً فى فيروس الدرة المغزلية فى البطاطس PSTVd تكون ذات اهتمام خاص بسبب أن تتبعها يكون مميزاً لجميع صف Class الفيرويدات. إن ما يسمى صف PSTVd من المفروض أن يكون هو الأساس فى نشوء الفيرويدات. إن CCR تتكون من منطقة عليا UCCR ومنطقة سفلى LCCR (شكل ٣٢) واللذان معاً يشكلان قطعة من التركيب شبه العصى الأصيل للفيروس. وحسب معلوماتنا الحالية (١٩٩٤) عن تجهيز الفيروس، هذا يعنى الانشطار للخييط الموجب - strand in Oligomeric Plus intermediate من وحدة الطول واللحام لتكوين الدائرة كل ذلك يحدث فى الـ UCCR. إن وسيط التناسخ يجب أن يخضع لتحولات تركيبية معينة ليعمل كقالب لتجهيز أنزيمات العائل وإن منع مثل هذا التحول بسبب تداخل RNA مضاد المعنى يمكن أن يثبط تجهيز الفيروس وبالتالي تناسخ الفيروس فى الطبيعة.

فى الجزء الثانى من هذه الدراسة فقد أختير cDNA ليفطى النصف الأيسر فقط من التركيب الثانوى شبه العصى للفيروس كتركيب RNA مضاد المعنى ضد تناسخ الخييط السالب الوسيط. هناك مستوى منخفض جداً من الخيوط السالبة

الوسيط في خلايا النبات المصابة بالمقارنة مع ذرية الفيروس الدائرية. إن تركيز الخيوط السالبة يصل إلى مستوى أكثر تبكيراً خلال الإصابة منه في Plus mono mers مبيئاً أن الوسيطات السالبة تكون إما قد بنيت على معدل منخفض أو تخلل بسرعة أكثر عند مقارنتها مع Plus monomers. وبالتالي فإن توجيه RNA مضاد المعنى ضد minus - sense oligomers يمكن أن يكون ذو استراتيجية أكثر كفاءة من التوجيه ضد ذرية الفيروس Plus - Sense Viroid Progeny.

ولقد تبين قبل ذلك أن القطع القصيرة من ال DNA وال RNA المكملة تستطيع أن تثبط الإصابة بالفيروس، هذا ما وجدته Matousek سنة ١٩٩٤. هذه القطع كانت تخضع في المعمل مع PSTVd والمعد المتكون سابقاً كان يحقن في النبات كان التثبيط أكثر فعالية عندما كان التحضين يجري على درجات حرارة عالية حيث التركيب الثانوي للفيروس كان يذتر. وكنتيجة لهذه المعطيات فإن مركبات RNA مضاد المعنى الفيرويدي من الممكن أن لا يتكون تحت الظروف الفسيولوجية، التجهيز الخلوي لكل من بناء الفيروس وال RNA مضاد المعنى ذو الفائدة وتكوين المركب يجب أن يقلد ويدرس في المعمل تحت الظروف الفسيولوجية. بناء وسيطات تناسخ الفيروس وال RNA مضاد المعنى يمكن أن تجرى في المعمل عن طريق النسخ من قوالب DNA باستعمال أنزيم RNA Polyme T₇ rasc وتكوين مركبات بين RNA الهدف ومضاد المعنى، يمكن أن يتبع ذلك تقدير كمي بواسطة المدرج الحراري للهجرة الكهربائية في الجيل- Temperature gradient gel electrophoresis والذي يرمز له TGGE وبواسطة الأجسام المضادة anti dsRNA antibodies. لقد ظهر أن ال RNAs مضادات المعنى المختارة ضد الخيط الموجب وأيضاً ضد وسيطات تناسخ الخيط السالب تشكل مركبات ثنائية الخيط متخصصة مع أهدافها تحت الظروف الفسيولوجية، وهذا وسيط لـ RNA مضاد المعنى ذو أهمية في تأثيرات التثبيط على إصابة الفيروس قد لوحظت في الطبيعة باستعمال نباتات بطاطس تجهز RNA مضاد المعنى.



شكل رقم ٣٢ :

RNA مضاد المعنى والهدف. A = تركيب ثانوى للفيروس PSTVd مع المنطقة المحفوظة المركزية (UCCR/LCCR) وموقع VL+ مضاد المعنى (الخط السميك) والذي يوجه ضد نسخ سالب الخط. B = توضيح UCCR و Anti LCCR مضاد المعنى مع التابع التكميلى لتتابع الفيروس (٧٩ - ٩٦) و anti R تمثل RNA التكميلى مضاد المعنى لتتابع الفيروس (٩٣ - ١١٠). C = التركيب الثلاثى المحزونى المتكون بواسطة وحشتين من UCCR. D = تركيب ديسر المتكون ضمن الجزيء فى القواعد الزوجية للتركيب UCCR.

النتائج Results

١ - تحليل المركب المتكون من RNA مضاد المعنى و RNA الهدف فى المعمل :

إن RNA مضاد المعنى أختير ضد المنطقة المركزية العليا المحفوظة (UCCR) شكل ٣٢ فى نسخ الشريط الموجب بسبب دوره الأساسى فى تجهيز الفيروس. هناك فى وسيطات تناسخ ال Oligomeric إثنان من UCCR من الممكن أن تشكل منطقة حلزونية (لولبية) ثلاثية ثابتة مكونة من ٢٨ زوج قواعد معترضة بواسطة إثنين فقط

من العروات الصغيرة الداخلية (شكل ٣٢، C). هذا التركيب يكون نتيجة نوع التتابع المتعكس Palindromic لمنطقة UCCR. كذلك أيضاً فإن RNA مضاد المعنى إذا تكامل مع الطول الكامل لمنطقة UCCR يستطيع أن يشكل تركيبات لجزئ داخلي ثابت حلزوني ثلاثي أو تركيب دبوس الشعر I (شكل ٣٢، D). هذه التركيبات بإمكانها أن تتنافس مع المركبات المتكونة من RNA الفيرويدى ومضاد المعنى. من أجل ذلك الغرض أيضاً فإن إثنين من RNAs مضاد المعنى أقصر اختيراً مكملان للجزء اليسار L anti أو للجزء اليمين من UCCR anti R (شكل ٣٢، B). الذى يمكن ملاحظته فى الهجرة الكهربائية فى آل-Polyacrylamide gel أن ال RNA مضاد المعنى ذو الطول الكامل فإنه فعلاً يشكل أساساً (إلى حد بعيد) Dimers أو جزئ يبنى لدبابيس الشعر. هذا أدى إلى الاستعمال الكبير لتتابعات مضاد المعنى الأقصر anti L و anti R بالنسبة للإختبارات المعملية بالإضافة إلى تحولات النبات. إن نسخ الخيط الموجب Dimeric من الفيرويد PSTvd تعمل كالنموذج الأصغر لوسيطات نسخ أكبر. إنها تمتلك موضعين للانشطار وموضع واحد للاتحام رغم أن التجهيز يمكن أن يحدث على موضع واحد فى الفيرويد.

إن تحليل المركب المتكون بواسطة الطريقة TGGE لها من الفوائد أكثر من الطرق الأخرى حيث أنها تسمح للباحث ليس فقط بفصل RNA المعقد من غير المعقد ولكن أيضاً للتفريق بين أشكال ال RNA المختلفة. لقد طبقت أول مرة سنة ١٩٨٨ بواسطة Hecker et al لتحليل المركب المتكون من خيوط سالبة وموجبة مع تتابع PSTvd. فى هذه التجربة إقتصرت التحليل على ما يسمى تجربة ما قبل النسخ Pre-transcription التى فيها كان RNA مضاد المعنى موجوداً مسبقاً فى الخلوطة عندما بدأ نسخ نسخة من ال Dimeric.

إن التحليل بطريقة TGGE أجرى مباشرة بعد توقف النسخ بواسطة إضافة ٥ مللى مول EDTA. يظهر على الجيل فى شكل ٣٢، A الذى فيه المركب المتكون مع anti L كان قد تحلل، عديداً من المنحنىات للتحول واضحة، هذه يشار إليها

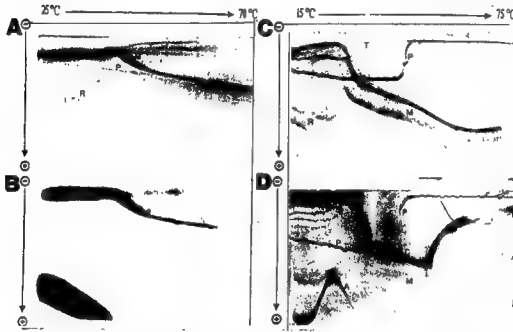
بواسطة R، M، T حيث حصل عليها مشابهة جداً لما ظهر عندما حلت نسخة من ال Dimeric فقط. يجب أن نذكر هنا بأن منحنى التحول M (عديد دبابيس الشعر) يكون مميز لموقع اليمين بعد النسخ، هذا التركيب لا يكون في توازن ثرمو ديناميكي ولكن يخضع لتغيرات بطيئة في تركيبات مثلث بواسطة منحنيات T (حلزون ثلاثي، شكل ٣٢) و R (شبه عصوي في شكل ٣٢) بالإضافة إلى الثلاثة منحنيات R، M، T فإن الشرائح بين T و M تظهر بوضوح والتي يمكن أن تكون نشأت من مركبات نسخة RNA مضاد المعنى. أما الشريحة P تتبع إلى ناقلات نسخ البلازميد التي لم تزال من المحلول. يمكن أن يعرف المركب تعريفاً لا لبس فيه من الصورة الإشعاعية الذاتية (شكل ٣٣، B) من التجربة المثالية. يبدو واضحاً أن RNA مضاد المعنى المعلم إشعاعياً يهاجر ضمن منحنى التحول لتركيب M وضمن الشرائح الإضافية الأضعف. في دراسات أخرى معملية متضمنة المعاملة بالحرارة للمركبات لنقل التركيب M إلى تركيب T أظهر أن حوالي ١٠٠٪ من تركيب M كانت متراكبة بواسطة RNA مضاد المعنى. من التحليل في شكل ٣٣، B، يبدو واضحاً أن معقدات نسخة RNA مضاد المعنى تكون ثابتة لدرجة حرارة ٦٥°م. أما التحليل لـ anti R RNA أعطى نتائج مشابهة جداً.

المعقد المتكون من RNA VL₊ (شكل ٣٣، A) ونسخاً سالبة الخيط Oligomeric درست باستعمال TGGE وطرق dot-ELISA. إن الخيط السالب دايمر ك قد نسخ من pRH718 بدون وجود RNA مضاد المعنى وحلل بالطريقة TGGE (شكل ٣٣، C) وبالمثل كما في النتائج على نسخ الخيط الموجب، هناك ثلاثة تركيبات مختلفة يمكن اكتشافها. إن التركيب السائد الذي يميز للموقع المباشر بعد النسخ يمثل بالمنحنى M والتركيبات الثابتة R و T تكون موجودة بتركيزات منخفضة فقط. إن الشريحة ذات الكثافة الأكثر انخفاضاً ولكنها في موضع موازى لـ M من الممكن أن تمثل نهاية مبكرة. بعد النسخ المبكر للحمض RNA مضاد المعنى فإن

تأثير ربط RNA مضاد المعنى يكون واضحاً في شكل (٣٣، D). إن التركيب غير المعقد لـ M قد تلاشى، بينما معظم الجزيئات (أكثر من ٩٥٪) هاجرت كمعقد C مع مضاد المعنى. إن RNA مضاد المعنى غير الداخل في المعقد يشار إليه بـ A. هذا الاتجاه يكون واضحاً من الهجرة الأكثر إنخفاضاً بالمقارنة مع الحالة غير المعقدة، من نفس موقع الجزيء الأحادي في المدى من ٣٠ - ٣٥ م ومن المواقع النمذجية للمخيوط المزدوجة المتجانسة بين ٥٥ - ٦٥ م. إن الأخيرة هذه تتكون من مناطق ثنائية الخيط مدنته جزيئاً مظهرة بوضوح كتأخير عفيف ومواقع غير مستمرة إلى حالة أسرع حركة على نفس الدرجة المرتفعة التي تكون مرئية فقط كشرائح مختلطة من RNA مضاد المعنى المفكك ونسخة دايمرك. الارتباط مع التركيبات الأخرى يمكن أن يحدث أيضاً ولكن لا يشارك بصفة معنوية. نظراً لأن التركيب المعقد يغير المنحنيات معنوياً فإن التعليم الإشعاعي كما في حالة الشكل ٣٣ B ليس ضرورياً، كما في النتيجة الهامة من التحليل بطريقة TGGE. يمكن القول بأن التركيب المعقد من RNA VL₊ مضاد المعنى والوسيطات من الخيط السالب دايمرك تحدث مع إنتاج يقارب ١٠٠٪ تحت الظروف التي تشبه الظروف الطبيعية (في الطبيعة). بعد تخضين RNA مضاد المعنى الذي نسخ كلية ونسخه خيط سالبه دايمرك على ٣٧ م وجد أن هناك ٣٠٪ من النسخ فقط من المعقد.

إن النتائج المتحصل عليها بواسطة TGGE قد تأكدت بواسطة طريقة Dot ELISA وذلك باستعمال جسم مضاد monoclonal متخصص لـ ds RNA. في الخطوة الأولى من التجربة فإن خمسة أضعاف مولر زيادة من RNA مضاد المعنى فوق RNA الهدف كانت حُضنت على حرارة مرتفعة ثم بردت إلى درجة حرارة التحليل. كما في جدول ١٩ فإن ds RNA قد تشكل بإنتاج أعلى عندما حُضن على درجات حرارة مرتفعة ولكن ١٠ - ٢٠٪ فقط من VL₊ قد لوحظت وكأنها في المعقد مع RNA الهدف على درجات حرارة مقارنة للحرارة الفسيولوجية. وعلى أية حال إذا كان النسخ للمخيوط السالبة ترايمرك قد حدث في المعمل في وجود RNA ثنائي الخيط مضاد المعنى موجب قبل النسخ، فإن التكوين يتجه تقريباً لتكملة المكونات التي يبدو وأنها في تركيز مولر منخفض. لم يكتشف معقدات

ds RNA وعلى أية حال بالنسبة لنسخ المائة وتسعون نيوكليتيدها لها نفس القطبية كما في RNA الهدف. حتى بعد النسخ فإن الهضم بأنزيم DNase والاستخلاص بالفينول فقط في الكمية الكلية من الحمض الأميني، هذا يعني أنه يمكن تحديد كمية الخيوط السالبة Trimeric والنسخ مضادة المعنى والنسبة المعوية للخيوط الثنائية لأي من الجزيئات يمكن تقديرها بصعوبة. يلاحظ أن إجراءات الهضم بأنزيم DNase، الاستخلاص بالفينول والترسيب التي تتبع النسخ لا تغير المدى لتكوين الخيط الثنائي.



شكل رقم ٢٣:

TGGE لمقد متكون بين RNA مضاد المعنى و RNA الهدف. الشريحة A و B تظهر تحليل مقدرات من RNA قصير مضاد المعنى (anti L) ونسخ دايمرك موجبة الخيط من الفيروس PSTVd بعد Pre-transcription للحمض RNA مضاد المعنى. شريحة A تمثل جيل مصبوغ بالفضة، شريحة B تمثل autoradiogram من RNA مضاد المعنى معلم إشعاعياً. إن أسرع شريحة في الهجرة في الـ autoradiogram تكون أكثر احتمالاً من مقدرات RNA مضاد المعنى مع النسخ المنتهية مبكراً. أما شريحة C فتمثل نسخة دايمرك سالبة الخيط. أما شريحة D فتمثل نسخة دايمرك سالبة الخيط بعد Pre-transcription مع VL+ لـ RNA مضاد المعنى. إن الشرائح معلمة لثلاثة تركيبات مختلفة (R, T, M) = التركيب الثلاثي الحلزوني، M = تركيب متعدد دبابيس الشعر، R = التركيب المتطاوّل شبه المعصوي للفيروس الموجود في الطبيعة. أما P فهي ناقل النسخ.

جدول ١٩ : اكتشاف ds RNA بواسطة dot ELISA.

درجة الحرارة الأولية للتهجين °م	٩٠	٨٠	٧٠	٦٠	٥٠	٤٠	٣٠
كمية المواقع المستهدفة %	٦٥	٦٥	٦٥	٦٥	٥٠	٣٠	١٥

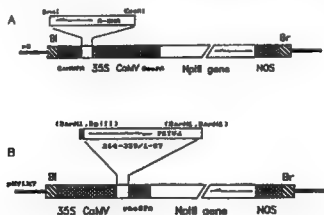
٢. تعبيرات RNA مضاد المعنى فى نباتات البطاطس المحولة وراثياً:

إن ناقلات التعبير تحمل تتابعات مضاد المعنى بعد بدء النسخ، إن 35S CaMV المحفز ملاحظة فى شكل ٣٤. أما فى شكل ٣٤، A فإن التركيبات من anti R و anti L مع مواقع CaMV Polyadenylation تكون موصوفة. هناك تركيبان آخران مشار إليهما anti RvT و anti LvT، موقع ال Polyadenylation قد شطبت. إن ناقل التعبير لتتابع مضاد المعنى VL₊ يحمل إشارة rbsC ل Polyadenylation (شكل ٣٤، B). علييات التعبير نقلت إلى جينوم البطاطس بواسطة الناقل A. tumefaciens والدورة الأولى من الاختبار أجريت على أساس مقاومة التجذير فى الخلفة ل Kanamycin. إختبرت نباتات البطاطس المحولة وراثياً واختبرت لتعبير RNA بواسطة طريقة تحليل Northern.

فى النباتات التى حولت لتعبيرات RNA مضاد المعنى ضد UCCR، فقط فى المتحولات فقدت جزء من مواقع ال Polyadenylation (anti LvT, anti RvT) تعبير RNA مضاد المعنى أمكن اكتشافه. فى ١١ من ١٢ من المتحولات فإن RNA مضاد المعنى قد اكتشفت. كما هو ملاحظ فى شكل ٣٥، A فإن الحجم كانت حوالى ٥٠٠ - ٦٠٠ نيوكليتيده بدلاً من الحجم المتوقع ٢٥٠ نيوكليتيده. من الممكن أن يكون ذلك فى الشطب فى مواقع ال Polyadenylation النهاية الصحيحة ل RNA مضاد المعنى يكون مشوهاً ومنتجات أطول قد بنيت. التعبير لمنتجات مختلفة (٥٠٠ - ٦٠٠ نيوكليتيده) يمكن أن تكون نتيجة مراحل غير ناضجة مختلفة من النسخ. ومن المحتمل أيضاً أن تركيبات ال anti RvT و anti LvT فقط مع مواقع النهايات الطرفية disorted تنتج RNAs مضاد المعنى ذوات كاف والتى يمكن اكتشافها بطريقة Northern analysis. لكى نتأكد من أن الإشارات المكتشفة فى شكل ٣٥، A الجزء العلوى ليست النتائج للإصابة الفيرويدية ولكن

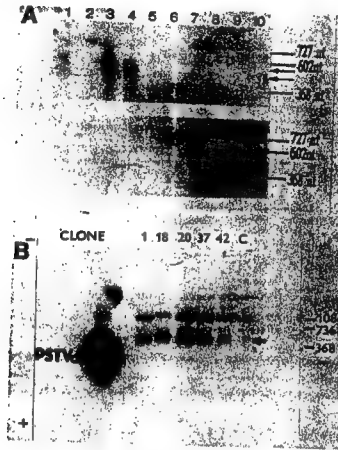
من تعبيرات RNA مضاد المعنى، إن التهجين المنظم مع نسخ خيط سالبة معلمة إشعاعياً من PSTVd كانت منجزة. إن الشكل ٣٥، A الجزء السفلى يبين عدم وجود إشارات من PSTVd الدائري يمكن اكتشافه في النباتات المحولة وراثياً.

هناك ٦ كلونات محولة مع التراكيبات VL₊ أظهرت تعبيرات لـ RNA خاص والتي لم تكن ملاحظة في نباتات الكنترول (الشكل ٣٥، B). إن طول الـ RNA كان حوالي ٦٠٠ قاعدة. وعلى هذا الأساس فإن القطعة مضادة المعنى الخاصة بـ PSTVd (١٨٣ قاعدة) مساوية ٣٠٪ من مجموع ما عبر عنه RNA. لم تستعمل ظروف غسيل شديدة بعد التهجين وبالتالي فإن بعض الشرائع غير المتخصصة في الـ auto-radiogram لم يمكن استبعادها. وحسب التقدير الأولي فإن كمية RNA مضاد المعنى الكاملة تختلف من ٠,٥ - ٢,٥ ميكوغرام لكل ٣٠ ميكوغرام من مجموع RNA معتمداً على Clone analysed. إن الإشارة الملاحظة لكلون ٦ قورنت مع الإشارة التي تلاحظ عادة لكلون ١.



شكل رقم ٣٤:

عوامل تحول النبات للتعبير عن RNA مضاد المعنى. شكل A: ناقل مكوّن للتعبير عن RNA مضاد المعنى ضد الـ UCCR. إن DNA A - يحتوي ١٨ قاعدة زوجية من النيوكليوتيدات القصيرة للمهجة (Anti L / Anti L) أو (Anti R / Anti R) مع أربعة نيوكليوتيدات إضافية كبرى لتكرز لانتاج موقع محدود EcoRI و Smal. أما شكل B فهو ناقل مكوّن للتعبير عن RNA - VL₊ مضاد المعنى ضد نسخ سالبة الخيط. توجيه تنابعات RNA الفيريدي مشار إليه بأرقام. المواقع المحدودة المستعملة للكلونة موضوعة في أقواس. أما الملب السوداء فهي مواقع التتابع المنسوخ المرجح من الناقل 35 SCaMV هو فيرس موزايك القرنبيط أما 35S فهو البروموتور و CaMVPA و rbcSPA فهي التتابع للبولى ادينيليشن. NOS، NptII، جين و OcaPA هي مشع nopaline synthase، الثيواميس فسفوترانسفيراز II جين وتتابع البولى ادينيليشن كجين OCS. وكللك فإن B₁، B₂ الحافة اليسرى والحافة اليمنى.



شكل رقم ٣٥ :

تعبير RNA مضاد للمعنى فى نباتات البطاطس المحولة وراثياً. شكل A. تحليل RNA مضاد المعنى قصير ضد UCCR. أما الشكل (A) العلوى فهو تحليل بالنورئين بلوت لنسيج ورقة (RNA) محول وراثياً. (١، ٢، ٣، ٤، ٥ و ٩) و ١٠ كـنترول بعد دئرة الأجاروز والهجرة الكهربائية فى الجـل. شريحة ٦ = ١٠ نانوغرام خيط دايـرك موجب من نسخ PSTVd (٧٧٧) نيوكليـتيد و ١٠ نانوغرام من نسخ PSTVd خيط مونوميرك سالب (٣٦٨) نيوكليـتيد. شريحة ٧ = ١٠ نانوغرام من نسخ PSTVd خيط موجب (٦٠٢) نيوكليـتيد. شريحة ٨ = ١٠ نانوغرام مستخلص خام من PSTVd. الجزء السفلى A نفس بقعة RNA كما فى الجزء العلوى ولكنها غسـلت وأعيد تجهينها مع نسخ PSTVd سالبة الخيط معلمه للكشف عن PSTVd تناهات موجبة. أما شريحة B تحليل لـ RNA مضاد المعنى ضد نسخ سالبة الخيط. حوالى ٥٠ بيكوغرام من الفيروـيد PSTVd الطـبيعى أضيفت إلى الموقع المعلم فى اليسار. C = RNA من نباتات بطاطس غير محولة وراثياً. تـدل الأسهم على RNAs مضاد المعنى مـعبراً فى النباتات المحولة وراثياً.

٣ - تثبيط الإصابة الفيرويدية في النباتات المحولة وراثياً:

للدراستات الحيوية فإن النباتات المحولة وراثياً تكون قد تكاثرت خضرياً وتضاعفت. بالنسبة للـ anti R و anti L فإن مجموعات محولة من ١٢ نبات من نفس النبات الواحد المتحول حققت بمستخلص خام من PSTVd. بعد ٤ و ٨ أسابيع حلت كمية آل PSTVd وقورنت مع تلك الموجودة في نباتات الكنترول. بسبب المهاجمة الفطرية فإن جميع النباتات من أنواع الـ anti RvT و anti LvT ماتت قبل الكشف عن محتوياتها من الفيرويد. هذا كان من سوء الحظ نظراً لأن تعبيرات RNA مضاد المعنى قد اكتشفت فقط في هذه النباتات.

مع أنه لم يكن من المحتمل اكتشاف RNA مضاد المعنى في النباتات المحولة ذات النوع anti L و anti R، فإن هناك ثلاثة متحولات أظهرت خفضاً في القابلية للإصابة بالفيرويد PSTVd بعد أربعة أسابيع شكل ٣٦؛ الجزء العلوى. فمثلاً في الحالة ذات ١٢ متحول فقط ٢ من ١٠ عقل أظهرت محتويات من PSTVd يمكن اكتشافها وحتى في هذين الإثنين فإن كمية آل PSTVd كانت أقل منها في نباتات الكنترول A. وعلى أية حال فإنه بعد ٨ أسابيع من الحقن فإن محتوى جميع النباتات المحولة من الفيرويد كان متقارباً مع الكنترول (شكل ٣٦ الجزء السفلى). وبالتالي فإن الإصابة الفيرويدية لم تكبح بثبات في النباتات المحولة وراثياً ولكنها تأخرت بشكل معنوى. عندما إختبرت هذه النباتات بعد التكاثر الخضرى المتتابع لمعرفة حيوية الفيرويد فإن تأخر تضاعف الفيرويد لم يمكن تأكيده كتأثير معنوى.

إن الستة VL₊ المختارة من كلونات البطاطس إختبرت عن طريق التقدير بمقياسين، فهرس الحيوية بالإضافة إلى كمية الفيرويد في النباتات المصابة. بالنسبة للطريقة الأخيرة فإن الإصابة صنفت إلى أربعة درجات. نتائج إختبارات مثل هذه الإصابة موجودة في جدول ٢٠. إن إحدى وعشرون يوماً بعد الحقن (P.i) فإننا عادة ما نلاحظ إصابة ضعيفة جداً للفيرويد PSTVd ومعظم النباتات المصابة تقع

فى رتبة ثلاثة وأربعة، نموذجياً مع ٠,٠٣ - ٣ بيكوغرام من الفيرويد لكل ملغرام من المادة الطازجة. مقارنة فهارس الحيوية لكلونات مختلفة ومجموعة الكنترول فى هذا الوقت تدل على خفض معنوى احصائياً للإصابة فى كلونات ١، ٦، ٢٠ و ٣٧ عند مقارنتها مع الكنترول غير المحول. فمثلاً فإن قيمة G كانت ٢٣، ٢٦، ٢٤ و ١٨ لكلونات ١، ٦، ٢٠ و ٣٧ بالترتيب. إن التساوى فى النسبة المئوية للنباتات المصابة يجب أن يطرح على مستوى ٠,٠٠١ من المعنوية الإحصائية. بالنسبة لكلون ١٨ فإن الاختلافات كانت معنوية على مستوى ٠,٠١ ولم يكن هناك اختلافات معنوية ملاحظة بين كلون ٤٢ ومجموعة الكنترول. كذلك فإن النتيجة قد أوضحت فرق كبير بين مختلف الكلونات المتحولة. فى بداية الإصابة (٢١ يوم بعد الحقن) فإن جميع النباتات المحولة وراثياً والمحقونة كانت (باستثناء واحد من كلون ٢٠) هذه فقط ضعيفة الإصابة (مرتبة ٣ و ٤)، بينما أكثر من ٤٠٪ من نباتات الكنترول المحقونة تقع فى مرتبة ٢، هذا يعنى نباتات متوسطة الإصابة. أخيراً فإن ٣٥ يوم بعد الحقن فإن جميع فهارس الحيوية قد إزداد لكن لا يزال معظم الكلونات تختلف معنوياً عن الكنترول. مع أن مستوى PSTVd قد ازداد بشكل مثير، فإن متوسط كمية آل PSTVd فى الكلونات المصابة كان بشكل واضح أقل منه فى نباتات الكنترول. وعلى أية حال فإن كلون ٤٢ لم يختلف عن مستوى الكنترول (جدول ٢٠) هذه تؤكد بشكل عام الملاحظات التى شوهدت من قبل. هناك إصابات أقوى شاملة إلى حد ما قد حصل عليها بعد ٣٥ يوم من الحقن بالمقارنة فى التجربة فى جدول (٢٠، b) ومعظم النباتات المحقونة كانت مصنفة فى مراتب الإصابة ١ - ٣. فى سلسلة إختبارات الحيوية الثانية لقد تم إختيار تجمعات الفيرويد فى أنابيب. بالنسبة لكلونات ١، ٢٠ و ٣٧ فإن نسبة الأنابيب المصابة قدرت بعد ٩٠ يوم من الحقن (جدول ٢١)، هذه النتائج أوضحت فى الأنابيب نفس النزعة كما فى نسيج الورقة الأخضر.

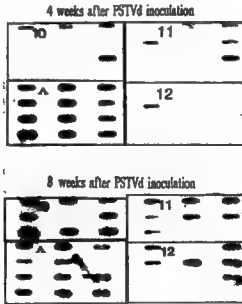
جدول ٢٠ : إختبار الإصابة في نباتات البطاطس المصابة وراثياً.

عدد النباتات المصابة	عدد النباتات المصابة	عدد النباتات المصابة	عدد النباتات المصابة	عدد النباتات المصابة	عدد النباتات المصابة	عدد النباتات المصابة
١	٢	٣	٤	٥	٦	٧
A : إختبارات الإصابة ، ٢١ يوم بعد العلق.						
١٧	١٧	١٧	١٧	١٧	١٧	١٧
٢٤	٢٤	٢٤	٢٤	٢٤	٢٤	٢٤
١٥	١٥	١٥	١٥	١٥	١٥	١٥
١٨	١٨	١٨	١٨	١٨	١٨	١٨
٢٠	٢٠	٢٠	٢٠	٢٠	٢٠	٢٠
٣٧	٣٧	٣٧	٣٧	٣٧	٣٧	٣٧
٤٢	٤٢	٤٢	٤٢	٤٢	٤٢	٤٢
٢١	٢١	٢١	٢١	٢١	٢١	٢١
٢١	٢١	٢١	٢١	٢١	٢١	٢١
B : إختبارات الإصابة ، ٣٦ يوم بعد العلق.						
١٧	١٧	١٧	١٧	١٧	١٧	١٧
٢٤	٢٤	٢٤	٢٤	٢٤	٢٤	٢٤
١٥	١٥	١٥	١٥	١٥	١٥	١٥
١٨	١٨	١٨	١٨	١٨	١٨	١٨
٢٠	٢٠	٢٠	٢٠	٢٠	٢٠	٢٠
٣٧	٣٧	٣٧	٣٧	٣٧	٣٧	٣٧
٤٢	٤٢	٤٢	٤٢	٤٢	٤٢	٤٢
٢١	٢١	٢١	٢١	٢١	٢١	٢١
٢١	٢١	٢١	٢١	٢١	٢١	٢١
C : إختبارات الإصابة بعد نصف سنة من التكاثر العشوي ، ٣٥ يوم بعد العلق.						
١٧	١٧	١٧	١٧	١٧	١٧	١٧
٢٤	٢٤	٢٤	٢٤	٢٤	٢٤	٢٤
١٥	١٥	١٥	١٥	١٥	١٥	١٥
١٨	١٨	١٨	١٨	١٨	١٨	١٨
٢٠	٢٠	٢٠	٢٠	٢٠	٢٠	٢٠
٣٧	٣٧	٣٧	٣٧	٣٧	٣٧	٣٧
٤٢	٤٢	٤٢	٤٢	٤٢	٤٢	٤٢
٢١	٢١	٢١	٢١	٢١	٢١	٢١
٢١	٢١	٢١	٢١	٢١	٢١	٢١

١ - رتبت الإصابة حسب كمية الفيرويد PSTVd في الأوراق المصابة: ١ = قوي، ٣٥ - ١٠ ميكروغرام / ملغ مادة طازجة. ٢ = متوسطة: ١٠ - ٣ ميكروغرام / ملغ. ٣ = ضعيفة = ٣ - ٠,٣ ميكروغرام / ملغ، ٤ = آثار = ٠,٣ - ٠,٠٣ ميكروغرام / ملغ

جدول ٢١: تحليل الإصابة بفيريود PSTVd في درنات البطاطس. لحقن النباتات المتكاثرة خضرياً يكون مشابهاً لتلك التي في الجدول السابق رقم C.

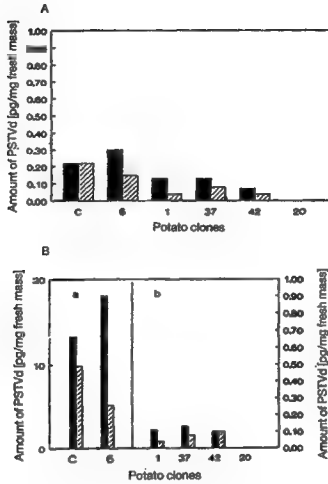
انكثرون المحول	عدد الدرنات المختبرة على عدد النباتات التي هي حاملة الدرنات	% الدرنات المصابة
١	٢٧/١٠	٤٤
٢٠	٢٦/١٠	١٩
٣٧	٣١/١٠	٧٧
٩٥	٣٨/١٥	٩٥



شكل رقم ٣٦:

تخطيط الإصابة الفيريودية في نباتات البطاطس المحولة وراثياً. تحليل حقن PSTVd في الطرز المحولة وراثياً (١٠، ١١، ١٢) وفي الطراز غير المحول وراثياً للكنترول. A الطرز المحولة وراثياً ١٠ و ١١ حقولت مع RNA anti R مضاد للمعنى، الطراز ١٢ مع RNA anti L مضاد للمعنى. عقل البطاطس حققت بمستخلص خام من النباتات المحقونة، وحزل الحمض النووي بعد ٤، ٨، أسابيع. نقلت مضاعفات من المستخلص على غشاء نايلون وهيجت مع نسخة PSTVd سالبة الخط. إختبرت عشرة أفراد من كل طراز بمحول وراثياً أننا في الشريحة الأسفل فإن تسعة نباتات من طراز ١٠ و ١١ وعشرة نباتات من طراز ١٢ بالترتيب.

يمكن تلخيص النتائج المتحصل عليها سابقاً بأن هناك إختلافات كبيرة ليس فقط بين الجينوتايب المختلفة ولكن أيضاً بين مختلف النباتات من نفس الكلون ضمن التجربة الواحدة. عند مقارنة التجارب المختلفة بعد التكاثر الخضري لـ VL₊ المتحول جدول ٢٠ أدى إلى وجود على الأقل نجينوتايب واحد كلون ٢٠، أظهرت مستوى ثابت منخفض من الإصابة بالفيروس PSTVd وبالتالي أظهرت أعلى الدرجات من التثبيط للإصابة بالفيروس. من ناحية أخرى حتى ضمن هذا الكلون فإن النباتات المصابة بشدة (مرتبة ١) قد لوحظت، هذا أدى إلى الاقتراح بأن المقاومة المحتملة يمكن أن تتحقق عن طريق التوسط بواسطة RNA مضاد المعنى لم تعمل، إذا كان من الممكن أن بعض المستوى البسيط من الفيروس وصل في نسيج النبات. إن الاختلافات العالية في تجمع الفيروس حتى ضمن الجينوتايب الواحد يمكن أن تنتج من إختلاف تعبير RNA مضاد المعنى في النسيج المختلف من الممكن أن يتسبب عن DNA methylation وخفض التعبير في علب DNA - T. لكي نجعل التجربة في ظروف مثالية يؤخذ عديد من ال Subclonings من الجينوتايب VL₊ المحول وتوضع على بيئة محتوية 5 azacytidine وأجرى إختبار The leaf disc agroinoculation تحت ظروف إضاءة وحرارة قياسية في Clima - boxes (شكل ٣٧). إن فحص معدل تجمع الفيروس أظهر مستوى منخفض جداً من التجمع بعد عشرة أيام من ال agroinoculation. بعد ٢٠ يوم ظهرت تجمعات قوية للفيروس في أقراص الورقة الكنترول وفي أقراص ورقة كلون رقم ٦. كان هناك إنخفاضاً شديداً في مستوى التجمع لوحظ في كلونات ١، ٣٧ و ٤٢ ولم يمكن اكتشاف فيروس لكلون ٢٠. يجب أن نذكر هنا أنه لم يكن هناك إختلافات معنوية في مستوى PSTVd في الحلقة الخارجية ومركز القرص في تنوع الكنترول بينما المستوى من PSTVd قد إنخفض معنوياً في أنسجة مركز القرص من الجينوتايبات المحولة. هذا الميل أو النزعة لوحظت حتى في أقراص من الجينوتايب المصابة بشدة رقم ٦ شكل ٣٧، A.



شكل رقم ٣٧ :

مستويات من PSTVd في أغراس ورقة. A = التحليل بعد عشرة أيام من الحقن. B = التحليل بعد عشرين يوم من الحقن. الأرقام تدل على الكتلونات المحولة وراثياً. إن حرف C يدل على النباتات غير المحولة وراثياً. في شكل B الأعمدة في (a) تدل على التوجيه اليساري، في (b) التوجيه اليميني.

مناقشة النتائج :-

لقد سبق وبيننا أن RNA المتخصص لـ PSTVd متمائل الأزواج وأن ازدواج من نسخ مضادة المعنى طويلة غير كاملة مع PSTVd كانت فعلاً غير معدية فى نباتات الطماطم. هذه النتيجة أدت إلى الاقتراح بأن تداخل RNA - RNA يمكن أن يشكل حقيقة أساس وسيط لـ RNA مضاد المعنى يثبط إصابة الفيرويد. فى هذه الدراسة ثم إختيار RNA مضاد المعنى غير كامل ضد ال UCCR من الخيط الموجب وضد النصف اليسارى من وسيط التكاثر السالب لـ PSTVd لتحليل التأثير المثبط على إصابة الفيرويد فى النباتات المحولة وراثياً. كما ذكر سابقاً فإن التأثيرات المثبطة تصبح متوسطة بواسطة تعبيرات RNA مضاد المعنى الخلوى وقد ذكرت لبعض RNA الفيروسي للنبات و DNA الفيروسي، ولكن النتائج لا يمكن أن تنطبق على الفيرويدات خاصة بسبب الصفات التركيبية الخاصة للفيرويدات التى تشكل أزواج مضاعفة. هذه الصفة يجب اعتبارها خاصة بالنسبة لوسيطات التكاثر الأطول، والتى بطريقة أخرى يمكن أن تكون هدفاً مناسباً بسبب تركيزها المنخفض فى الخلايا المصابة. مجرد التحضين لـ RNA مضاد المعنى أو الهدف قد أظهر أن التحضين يجب أن يجرى على درجات حرارة عالية غير فسيولوجية لكى نحصل على إنتاج عال من المركب المعقد. لكى نوجه هذه المشكلة فى مصطلحات ثيرموديناميكية لإختبر التداخل بين RNA مضاد المعنى و RNA الهدف عندما بنى RNA الهدف تحت ظروف فسيولوجية بواسطة أنزيم T7 Polymerase فى وجود RNA مضاد المعنى قبل النسخ والمعد المتكون أجرى له تحليل بواسطة TGGE والاكتشاف بواسطة Immunochemical لـ ds RNA. هناك طرق مشابهة يكون من المحتمل أن تحدث فى الخلايا المحولة وراثياً بعد دخول الكائن الممرض النواة وتكون طريقة التناسخ قد ابتدأت. من التحليل بواسطة TGGE القول بأن إنتاج المعقد المتكون كان تقريباً ١٠٠٪. هذه النتيجة كان من السهل الحصول عليها من المعقدات مع النصف اليسارى من RNA مضاد المعنى، بسبب الانتقال الواضح فى الشرائح. المعقد المتكون من RNA مضاد المعنى القصير ضد

ال UCCR لم يقود إلى إنتقال معنوى ولكن يمنع التغير التركيبى فى RNA الهدف وعلى أساس هذا التأثير فإن ١٠٠٪ معقد متكون يمكن أن يستنتج. زيادة على ذلك فإن التحليل المعملى للمعقد المتكون بعد Pre-transcription RNA مضاد المعنى أظهر بشكل جلى واضح أن التركيب لوسيطات تناسخ الفيرويد التى توجد فى اليمين بعد عملية النسخ تكون أساسية لتكوين المعقد بينما الانتظار للتركيب المتوازن يمكن أن يمنع تكوين المعقد.

النباتات المحولة وراثياً حضرت معبرة عن RNA مضاد المعنى ضد الجزء اليمين واليسار من ال UCCR (مع تتابع كامل وشطب ال Polyadenylation) و VL₊ حمض RNA مضاد المعنى (الجزء اليسار من الفيرويد شبه العصبوى) ضد الخيط السالب. وجد أن تعبيرات RNA مضاد المعنى اكتشفت فى تحولات anti L_{VT} و anti R_{VT} (مع تأخير إشارة ال Polyadenylation) ولكن ليس فى متغيرات anti P و anti L هذا يمكن أن يوضح بعدم الثبات الكاف لهذه ال RNAs فى الطبيعة وعلى هذا الأساس يكون هناك تركيز منخفض جداً للكشف بواسطة Northern analysis. هناك سبب واحد لهذا الافتراض يكون بأنه يمكن اكتشاف T-DNA مضاد المعنى موحد لمتحولات anti L_{VT} و anti R_{VT} بالإضافة إلى متحولات anti R و anti L بواسطة التحليل بطريقة Southern. من الممكن اكتشاف تعبير RNA مضاد المعنى المنخفض فى متحولات anti L_{VT} و anti R_{VT} فقط بسبب RNA مضاد المعنى المعبر كان حوالى ٢٥٠ - ٣٥٠ نيوكليتيده أكبر من المتوقع وبالتالي ثبات أعلى منه فى ذلك الذى من متحولات anti R و anti L. إن VL₊ RNA المضاد المعنى المعبر فى الطبيعة أظهر تقريباً ٦٠٠ قاعدة فى الطول بحوالى ٣٠٪ من التتابع الخاص بمضاد المعنى، لا يمكن أن يحصل عليه بدون شك فى التجارب المعملية سواء RNA المعبر قد كون معقدات مع ال RNA الهدف بكفاءة مثل التى لوحظت فى النسخ المعملية. ولكن يبدو محتمل جداً نظراً لأن المعقد المتكون ذو معنى أو مضاد المعنى يفسد بواسطة تركيب الفيرويد

الجزء البيني وليس بواسطة ازواج قواعد متطابقة من تنابعات خاصة للفيروس مع تنابعات الناقل المتصلة أو ال Poly A tail.

درس تأثير RNA مضاد المعنى على كلونات بطاطس وحملت النتائج لمعرفة مدى التثبيط للإصابة بالفيروس PSTVd. أظهرت النتائج أن ظاهرة التثبيط وجدت فعلاً بسبب: أولاً، بعض الطرز المحولة وراثياً تظهر ثبات وخفض معنوي في الإصابة الفيروسية في النباتات والدورات بالمقارنة مع الكنترول، ثانياً، إنخفاض التركيز للفيروس اكتشف في بعض النباتات المحولة وراثياً إذا قورنت مع النباتات غير المحولة وراثياً وأجريت المقارنة خلال ثلاثة أسابيع بعد الحقن (جدول ٢٠، A) وحتى ٨ أسابيع بعد الحقن (شكل ٣٦). إن تثبيط الإصابة أو على الأقل التأخير في تضاعف الفيروس لوحظ في النباتات المحقونة بالإضافة إلى بعد Agroinfection.

مع أن تأثيرات التثبيط كانت معنوية، إلا أن إختلافات وراثية عالية قد لوحظت بين الطرز المختلفة، والأكثر أهمية الإختلاف العال الذي لوحظ ضمن كلون واحد متكاثر خضرياً. حتى من بين أكثر الكلونات مقاومة فإن بعض النباتات المصابة بشدة قد لوحظت. إن مظهر النسيج المصاب بشدة دل أيضاً في هذه الحالة على أن التثبيط بمضاد المعنى يمكن أن يتغلب عليه كلية إذا حصل على مستويات بداية من ال PSTVd في خلايا النبات عالية وإن سرعة تناسخ الفيروس لا تثبط لمدة طويلة. إن الاختلافات غير العادية الملاحظة هنا تختلف بوضوح عن DNA مضاد المعنى و RNA الوسيط في التثبيط الذي لوحظ في الدراسة السابقة، بينما المعقد RNA الفيروسي مضاد المعنى كان قد تشكل في المعمل قبل الحقن. في تلك الحالة فإن التأثير المثبط كان أكثر قوة، أقل إختلافاً ومعتمد أساساً على زيادة المولر لـ RNA مضاد المعنى زيادة عن PSTVd. إن التأثيرات الموصوفة هنا تختلف أيضاً عن معظم النتائج المتحصل عليها باستعمال RNA مضاد المعنى ضد Endogenous genes. في هذه التجارب كان هناك متغيرات كبيرة بين الكلونات المختلفة، أيضاً، لوحظت ولكن الكلونات الفردية عادة تسلك معدل منخفض ثابت من m RNA وبالتالي فإن ال فينوتايب الطافرة يمكن إختبارها.

لقد تبين من الدراسات الحديثة Wassenegger et al سنة ١٩٩٤ أن Genome integrated viroid cDNA يصبح متخصص methylated فوق تجمعات الفيرويد في نباتات الدخان المتحولة وراثياً. إن الباحث فسر هذه الظاهرة بواسطة إمكانية أن RNA الموجه ينتج من جليد ميثيليشن لتتابعات الجينوم. إن التغيرات العالية في وميطات RNA مضاد المعنى في تثبيط الإصابة الفيريودية في هذه التجارب (تجارب البحث الحالي) يمكن أن تفسر غالباً بهذه الظاهرة. إذا ما حدث وأن بعض حدود مستوى RNA الفيريوى قد إمتد فإن عملية الميثيليشن لـ Viroid - specific anti-sense gene يشجع (يرتفع). إن التناسخ غير المثبط من PSTVd يكون النتيجة المنطقية. إن ما وجد بأن تأثير مضاد المعنى كان أقوى عندما عوملت أقراص ورقة البطاطس خلال الحقن أيضاً بمادة azacytidine (مثبطة للميثيليشن) والتفسير بأن الاختلافات المعنوية بين كلونات البطاطس المختلفة يمكن أن تسبب عن أو بواسطة تأثير الموقع على DNA methylation وتكون متفقة مع الافتراضات المذكورة سابقاً.

إن ال Physiological mosaic المعروف جيداً في خلايا النبات من الممكن أن يقود أيضاً إلى تركيز RNA مضاد المعنى باختلاف من خلية إلى خلية حتى إذا نظم بواسطة محفز تأسيسى. إن المستوى الحدى الأولى من RNA الفيريوى يمكن أن نصل إليه بسهولة أكثر في هذه الخلايا بلون تعبيرات RNA مضاد المعنى أو بكمية بسيطة جداً منه، هذه الفيريودات يمكن أن تنتشر في الأنسجة المحيطة. من المعروف أن الفيريودات تتراكم بسرعة أكثر في النسيج المرستيمى ومن هناك يمكن أن تنتقل ضمن النبات خلال خلايا اللحاء هذا ما وجده Palukaitis سنة ١٩٨٧.

في هذا النسيج فإن التناسخ يمكن أن يحدث بمعدل أعلى، بينما مستوى RNA مضاد المعنى يمكن أن يكون غير كاف تماماً لأن يتداخل مع مسار التناسخ وبالتالي يقود إلى تنافس مختلف تماماً. من هذا الاتجاه فإن نتائج البحث تكون أكثر تشابهاً للتأثيرات الملاحظة لـ RNA الفيروى للنبات. بالنسبة للفيروسات المتجمعة

(فيروسات الجوزاء) مثل فيروس الموزايك الذهبى فى الطماطم TGMV والذى فيه ال DNA والفيروس يتكاثر داخل النواة، فإن تأثير مضاد المعنى كان أقوى جداً إذا كان إختبار التناسخ فى قرص الورقة قد تم (أُنجز) ولكن غير كامل فى بعض الطرز عند حقن النباتات المحولة السليمة. يمكن القول بأنه إذا كانت جينات RNA مضاد المعنى ناشئة مع محفزات غير حساسة لـ methylation DNA فإنها تكون أكثر فعالية.

رابعاً: الوقاية بالتضاد بين أربعة فيروسات:

Cross Protection Among Four Viroids

تعرف الوقاية بالتضاد على أنها التدخل فى التعبير العرضى عن طريق حقن متحدى (فيروس أو فيروس) فى النبات المصاب سابقاً. هذه الظاهرة قد أثارت اهتمام أخصائى الفيروس من علماء أمراض النبات وذلك منذ اكتشافها بواسطة McKinney سنة ١٩٢٩. إن ميكانيكية الوقاية بالتضاد لا تزال محل دراسة وأجرى عليها أبحاث كثيرة خاصة فيما يتعلق بالأمراض الفيروسية خاصة فيروس موزايك الدخان وترستيزا الحمضيات فى البرازيل.

أما عن الوقاية بالتضاد بالنسبة للفيروسات كان أول وصف لها سنة ١٩٦٧ بواسطة العالم Fernow. لقد وجد أن نباتات الطماطم *Lycopersicon esculentum* الصنف المزروع Rutgers يمكن أن يحفظ من الأعراض التى ستكشف نتيجة الإصابة بالسلالة الشديدة لفيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس PSTVd وذلك عن طريق الحقن المبكر بالسلالة المعتدلة لنفس الفيروس. زيادة على ذلك فإن العالم Fernow قد أظهر بأن السلالة الشديدة يمكن إعادة اكتشافها من نباتات الطماطم التى لم تظهر عليها الأعراض نتيجة الوقاية بالتضاد.

ملاحظة هذا البحث قام به مجموعتين من العلماء. الأولى فى جامعة روكفلر فى أمريكا وعلى رأسهم C. Niblett، والمجموعة الثانية فى وارسو بولندا وعلى رأسهم E. Paduch. Cichal وهى التى أمدتني بشكورة بهذه البحوث.

إن الدراسة التي أجريت على RNA بطريقة بصمة الأصبع Finger printing في كل من السلالة الشديدة والمعتدلة قد أظهرت أن هاتين السلالتين للفيرويد PSTVd فيهما اختلافات بسيطة فقط في تتابع نيوكليوتيداتها. لقد أجرى عدة أبحاث لتحديد فيما إذا كانت الوقاية بالتضاد التي بين الفيرويدات هي مقصورة فقط على تلك الفيرويدات التي تظهر درجة عالية من تماثل التتابع في أحماضها RNAs.

لكي نجري إختبارات الوقاية بالتضاد بين أى فيرويين فمن الضروري أن نلاحظ :-

- ١ - توفر العائل المشترك بين الفيروين موضوع الداسة.
- ٢ - دراسة سابقة لهذين الفيروين تثبت بأنهما يتناسخان في العائل المشترك.
- أجريت دراسة الوقاية بالتضاد على نباتات الطماطم و / أو نباتات الأقحوان وذلك باستعمال الفيرويدات الآتية :-
- ١ - السلالة الشديدة من فيرويد الدرنه المغزلية في البطاطس s - PSTVd.
- ٢ - السلالة المعتدلة من فيرويد الدرنه المغزلية في البطاطس m - PSTVd.
- ٣ - فيرويد اكسوكورتر الحمضيات CEVd.
- ٤ - فيرويد تقزم الأقحوان CSVd.
- ٥ - فيرويد الشحوب المتبرقش في الأقحوان ChMVd.

أظهرت الدراسات السابقة أن السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة وفيرويد اكسوكورتر الحمضيات تتناسخ في نباتات الطماطم، بينما الدراسات التي ذكرت عن بصمة الاصبع المذكورة سابقاً قررت أن السلالة الشديدة والمعتدلة لفيرويد الدرنه المغزلية في البطاطس ذات علاقة متقاربة جداً. أما عند المقارنة بين PSTVd وفيرويد CEVd لم يظهر مناطق واسعة ذات تماثل متقارب في RNAs التابعة لها.

نبات الأقحوان:

إن نبات الأقحوان *Chrysanthemum morifolium* عائل هام ومفيد في دراسة الفيروس. إن فيروس تقزم الأقحوان CSVd وفيروس الشحوب المتبرقش في الأقحوان ChCMVd قد اكتشفت أصلاً في هذا العائل وازدادت بشكل واسع في الأصناف المزروعة مثل Bonnie Jean بالنسبة للفيروس الأول، والصنف Velvet Ridge للفيروس الثاني. إن دراسات التهجين التي أجريت بين CSVd و PSTVd أدت إلى القول بأن حوالي ٢٠٪ من RNA في الفيروس CSVd يكون متماثل مع ذلك الذي في RNA لفيروس PSTVd. وبوضوح فإن اختلافات التتابع بين PSTVd و CSVd تكون كافية لإنتاج RNA مختلف كلية في بصمة الأصبع، ولكن يوجد تشابهات كافية تسمح بعملية Cross - hybridization محدودة. إن التطبيقات البيولوجية لهذا التماثل يمكن أن تختبر إذا أصابت هذه الفيروسات عائل مشترك.

لإجراء التجارب، في البداية يجب تحديد فيما إذا كان CSVd و ChCMVd يحدث لهما تناسخ في الطماطم وفيما إذا كنت السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة لفيروس PSTVd وفيروس CEVd تتناسخ في نبات الأقحوان ثم بعد ذلك يختبر كل فيروس لوحده لمعرفة مقدرة على الوقاية ضد الفيروسات الأخرى.

تحضير اللقاح:

. إن كلا السلالتين من PSTVd وفيروس CEVd حصل لهما أكتار وزيادة في نباتات الطماطم صنف Rutgers. إن اللقاحات من هذه الفيروسات حضرت عن طريق طحن الأوراق المصابة بالفيروس والمجمدة (١ : ١، W/V) في هاون ومدقة مع ٠.٠٤ مول فوسفات البوتاسيوم منظم، pH ٨، محتوياً ٠.٣٪ من 2-mercaptoe-thanol. أما الفيروسان CSVd و ChCMVd قد حفظا في نبات الأقحوان. اللقاحات تتكون من مستخلصات كاملة من الحمض النووي من نسيج مصاب

مركزاً بعشرة وعشرين ضعف بالترتيب على أساس وزن النسيج عن طريق الترسيب بالايثانول.

الاختبارات على نباتات الطماطم:

تُحقن نباتات الطماطم عن طريق تغفير فلقات البادرات (٢ - ٤ مراحل ورقية) بالكرابورات ثم تُحك الفلقات بماسحة قطنية مغمورة باللقاح (بالحلول المنظم في حالة الكنترول). تلاحظ التغيرات المرضية وتكتب بعد ٦٠ - ٧٥ يوم من الحقن. تنقى الفيرويدات من النباتات المصابة وتعلم في المعمل باليود المشع ١٢٥. يجرى التحليل بواسطة طريقة بصمة الأصبع ذات الاتجاهين لـ RNA قبل وبعد التكاثر في نباتات الطماطم. إن كلاً من السلالة الشديدة والمتعدلة في فيرويد الدرة المغزلية في البطاطس وكل من CEBVd و CSVd كل منهما أظهر صفات الـ RNA المميزة في بصمة الأصبع، هذا يدل على عدم وجود أى تداخل أو تلوث بين هذه الفيرويدات وأن هذه الفيرويدات تكاثرت بشكل نقى في النبات، إلا أن الاختبارات الحيوية فشلت في إثبات تناسخ الـ ChCMVd في نباتات الطماطم.

أما إختبارات الوقاية بالتضاد على الطماطم فقد أجريت كما ذكر Fernow سنة ١٩٦٧. كانت الحقنة الأولى في طور الفلقة، أما الحقنة بالفيرويد المتحدى فقد أجريت بعد ١٤ يوم، عندما كانت النباتات تحمل ٣ - ٤ مراحل ورقية وإن جميع الأوراق باستثناء أصغرها قد حقنت.

الاختبارات على نباتات الأقحوان:

في الإختبارات على نبات الأقحوان فإن ٦ - ١٠ عقل مجذرة (لها جذور) ذات طول ١٠ - ١٥ سم قد حقنت عن طريق وضع قطرة من اللقاح متوسطة الحجم على الساق ويعمل ٢٥ ثقب عميق خلال القطرة في الساق باستعمال نصبل مشروط نمرة ١١، تحفظ النباتات في الصوب الزجاجية على درجة ٢٢ - ٢٨ م أو في إطارات التتضد على درجة ٢٨ م وإضاءة ٢١٦٠٠ شمعة مع ١٦ ساعة إضاءة يومياً. كانت تحقن النباتات بالفيرويدات الخمسة المذكورة سابقاً.

الأعراض التي تظهر تدل على أن كل من الفيرويدات الخمسة قد تكاثرت. إن طريقة بصمة الأصبع لـ RNA لكل من العزلة الشديدة والعزلة المعتدلة و CEVd و CSVd أثبتت أنها قد عزلت من نباتات الأقحوان وقد أثبتت تطابق كل من هذه الفيرويدات. لم يكن باستطاعة بصمة الأصبع اكتشاف ChCMVd نظراً لانخفاض الناتج منها.

عند إجراء اختبارات الوقاية بالتضاد على الأقحوان فقد أجريت باستعمال ضعف التركيز من الحمض النووي من السلالة الشديدة والمعتدلة و CEVd و CSVd وعشرين ضعفاً من تركيز ChCMVd. أجريت الحقنات بالفيرويد المتحدى بعد ٤٠ - ٥٠ يوم على ساق غير محقون مظهراً أعراض واضحة للفيرويد الأول. النباتات المختبرة قدرت على أساس نوع الأعراض المنتجة، شدة الأعراض و / أو تاريخ ظهور العرض (جدول ٢٢). الأوزان والأطوال لنباتات الطماطم أيضاً سجلت في الملاحظات في نهاية التجربة.

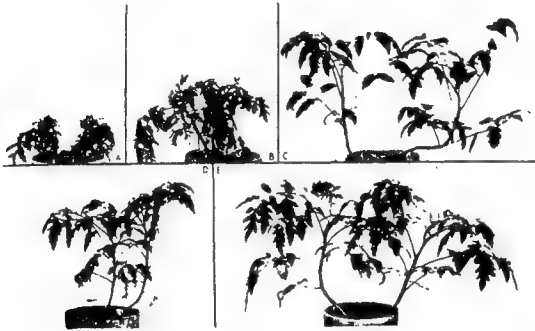
نتائج الاختبارات:

يمكن دراسة كل فيرويد بمفرده لمعرفة قدرته على أن يبقى محافظاً على نفسه ضد الفيرويد الثاني إذا كانت الأعراض التي ينتجها تختلف بوضوح من و / أو أقل شدة من الأعراض المتسببة في ذلك النبات بواسطة الفيرويد المختار (جدول ٢٢). يذكر وصف الأعراض لكل فيرويد على نباتات الطماطم والأقحوان مجمعة مع ذكر الوقت المطلوب لظهور التعبير العرضي بواسطة اختبار نصف الورقة في نباتات الطماطم.

١ - نتائج الاختبارات على الطماطم:

إن حقن نباتات الطماطم بالسلالة المعتدلة لوحدها سبب أعراضاً بسيطة جداً ولكنها خفضت الوزن وطول النبات بنسبة ٣٠٪ (شكل ٣٨ C، جدول ٢٣). أما نباتات الطماطم المحقونة بالسلالة الشديدة أو CEVd لوحدها تكشف عليها أعراض

شديدة مثل تقزم القمة الشديد، الالتفاف والتدلى والكرورز، هذه الأعراض نموذجية للسلالات الشديدة من PSTVd والفيروس CEVd وقد خفضت في الوزن بنسبة ٧٠ - ٨٠٪ وخفضت الطول بنسبة ٥٠٪ (شكل ٣٨ وجدول ٢٣).



شكل رقم ٣٨ :

الوقاية بالتضاد في نباتات الطماطم صنف Rutgers عن طريق الحقن بالتتابع بالسلالة المعتدلة من فيروس PSTVd وفيروس CEVd. الحقن الأول كان في طور الفلقات والحقن الثاني بعد ١٤ يوم من الحقن الأول. المعاملة A = حقنت CEVd مع منظم، B = حقنت بالمنظم أولاً ثم بالفيروس CEVd، المعاملة C = سلالة معتدلة ثم منظم، D = سلالة معتدلة ثم CEVd أما E = حقنت أولاً وثانياً بالمنظم. النباتات صورت بعد ٥٢ يوم من الحقن الأول.

جدول ٢٢: وصف الأعراض الفيريدينية والوقاية بالتضاد الناتجة في نباتات الطماطم والأعنوان.

الفيروسات	إختبارات الوقاية بالتضاد					الأعراض
	ChCMVd	CSVd	CEVd	PS	الأولم	الوصف
الطماطم CSVd	—	—	غير مؤكد	غير مؤكد	—	لا شيء
PM	—	غير مؤكد	+	+	٥٢	تحت اللؤلؤ في الطول والوزن
PS	—	—	—	—	١٨	تقرم شديد، تتلى أوراق، تكحل في القمة
CEVd	—	—	—	—	١٨	تقرم شديد، تتلى أوراق، تكحل في القمة
PM الأعنوان	—	—	+	—	—	بقع شاحبة متوسطة
ChCMVd	—	لا يوجد وقاية	لا يوجد وقاية	لا يوجد وقاية	—	نظام التفرش والشحوب
PS	—	—	+	—	—	بقع شاحبة، تقرم متوسط
CSVd	—	—	+	+	—	تقرم، بقع شاحبة، تتلى الورقة
CEVd	—	—	—	—	—	تقرم شديد وتتشو الورقة وشحوب

ملاحظات على الجدول: -

١ - زيت الفيريدات تصاعدياً حسب ازدياد شدة الأعراض. PM = السلالة المخلطة من فيروس الدرة للقرنية في البطاطس، PS السلالة الشديدة من فيروس الدرة للقرنية في البطاطس.

٢ - اليوم = يدل على (على الأقل) نصف البيانات المتغيرة أعطت تغييرات أعراض.

٢ - الوقاية بالتضاد أجريت كما هو موضح في الموضح. حقت البيانات أولاً بالفيروس المذكور في الجهة اليمنى من الجدول ثم بعد ذلك حقت بالتضاد (١٤) يوم في الطماطم، ١٠ - ٥٠ يوم في الأعنوان) بالفيروسات المذكورة في أعلى الجدول.
+ تعني حصلت وقاية. أما (-) تعني لم تسجل الشحوب.

جدول ٢٣: تأثير الحقن بالفيريود على تكشف الأعراض وفقدانها وعلى الوزن والطول في نباتات الطماطم صنف Rutgers.

المعاملات	الأعراض	الثقة	الأيام اللازمة للتطوير	Z متوسط الوزن بالنسبة للكتنول	Z متوسط الطول بالنسبة للكتنول %	للتأثير على
الحقن الأول	الحقن الثاني					
منظم	منظم	—	—	١٠٠	١٠٠	
PS	منظم	+++	١٨	٢٨	٤٨	
PS	CEVd	+++	١٨	٢٦	٥٣	
PS	PM	+++	١٨	٢٨	٥٥	
PS	CSVd	+++	١٨	٢٨	٥٦	
CEVd	منظم	+++	١٨	٢٠	٤٧	
CEVd	PM	+++	١٨	٢١	٤٤	
CEVd	PS	+++	١٨	٢٠	٤٦	
CEVd	CSVd	+++	١٨	٢٢	٤٧	
PM	منظم	+	٥٢	٦٧	٧١	
PM	CEVd	+	٥٢	٥٢	٦٨	
PM	PS	+	٥٢	٥٤	٦٥	
PM	CSVd	+	٥٢	٦٥	٧٠	
CSVd	منظم	—	—	٨٩	٩٨	
CSVd	CEVd	++	٥٢	٥٧	٦٧	
CSVd	PM	+	٥٢	٦٨	٨٥	
CSVd	PS	++	٥٢	٥٢	٦٨	
منظم	PM	+	٥٢	٧٨	٨٢	
منظم	CEVd	++	٣٦	٥٨	٦٠	
منظم	PS	++	٣٦	٤٣	٦٠	
منظم	CSVd	—	—	٩٣	٩٠	

ملاحظات على الجدول: -

١ - الحقن الأول كان في طور الفلقات. الحقن الثاني كان بعد الحقن الأول بمدة ١٤ يوم وفي طور أربعة أو ثلاثة ورقات. كان

هناك ١٤ نبات لكل معاملة. متوسط البروز للنباتات الكتنول ٥٥ غرام أما متوسط الطول كان ٤٨ سم.

٢ - فهرس الثقة كان (-) لا يوجد أعراض، (+) = أعراض محتملة، (++) أعراض متوسطة، (+++) أعراض شديدة يمكن ملاحظة ذلك في شكل ٣٨.

٣ - استمرت التمرية ٦٥ يوم. حسب اليوم عندما يظهر نصف أو أكثر من نباتات التمرية الأعراض المذكورة.

حقنت نباتات الطماطم أولاً بمنظم ثم بعد ذلك بالمتحدى مثل السلالة الشديدة أو CEVd، فكانت النتيجة أن تكشف أعراض فيروسية واضحة وخفضت حوالى ٥٠٪ من الوزن و ٤٠٪ من الطول (شكل ٣٨، B جدول ٢٣). مع أن الأعراض المميزة للفيرويد قد أنتجت فى هذه النباتات، إلا أن الأعراض كانت أقل شدة من تلك الواضحة فى شكل ٣٨، A، نظراً لأن النباتات كانت أكبر بمدة ٢ أسبوع عندما حقنت. على كل حال فإن تعبيرات الأعراض فى هذه المجموعة من النباتات معنوياً وأكثر شدة من تلك الملاحظة فى النباتات المحقونة فى اليوم الأول بالسلالة المعتدلة. النباتات التى حقنت فى اليوم الأول بالسلالة المعتدلة والمتحدى ثم بعد ١٤ يوم من ذلك بالسلالة الشديدة أو CEVd كانت غير متميزة عن تلك المحقونة بالسلالة المعتدلة لوحدها (شكل ٣٨، D و جدول ٢٣). وبالتالى فإن الحقن السابق بالسلالة المعتدلة حفظ هذه النباتات من تكشف أعراض فيروسية شديدة تتسبب عن السلالة الشديدة أو عن CEVd. النباتات الموجودة فى شكل (D، ٣٨) كانت قد اختبرت لإظهار القوة القليلة من الأربعة عشر نبات فى تلك المعاملة، علاوة على ذلك فإنها لم تظهر أعراض فيروسية. التجارب الأخرى المستعمل فيها خمسة عزلات إضافية أظهرت نفس الوقاية.

نباتات الطماطم المحقونة بالفيرويد CSVd لوحده لم يتكشف عليها أعراض مرئية ولم تكن مختلفة معنوياً عن النباتات غير المحقونة فى الطول أو الوزن (جدول ٢٢، ٢٣). وب نفس الطريقة فإن تلك النباتات المحقونة بالفيرويد CSVd والمتحدى مع سلالة معتدلة من PSTVd لم تختلف معنوياً فى الوزن والطول عن نباتات الكنترول المحقونة بعد ١٤ يوم بالسلالة المعتدلة. من ناحية أخرى بينما النباتات المحقونة بالفيرويد CSVd ثم حقنت بالمتحدى السلالة الشديدة أو الفيرويد CEVd، لحسن الحظ تكشف أعراض فيروسية وكان الخفض فى الوزن والطول مشابهاً للنباتات فى الكنترول (النباتات التى حقنت فى اليوم الأول بالمنظم وفى اليوم الرابع عشر حقنت بالسلالة الشديدة أو CEVd). إن ابتداء هذه الأعراض كان قد تأخر حوالى ١٦ يوم (جدول ٢٣). هذه النتائج تؤدى إلى القول بأن CSVd يتدخل مع نشوء

المرضية في نباتات الطماطم بواسطة السلالة الشديدة والفيروس CEVd. لقد حصل على مثل هذه النتائج المقتعة باختبارات مماثلة على نباتات الأقحوان.

٢ - نتائج الاختبارات على الأقحوان:

إن الأعراض الناتجة من السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة والفيروس CEVd والفيروس CSVd والفيروس ChCMVd يمكن تمييزها بسهولة في نباتات الأقحوان صنف Bonnie Jean (جدول ٢٢). إن الحقن بالسلالة المعتدلة، السلالة الشديدة أو الفيروس CSVd تحفظ نبات الأقحوان من إظهار تعبيرات عرضية للفيروس CEVd. وعلى أية حال فإن ChCMVd لم يكن حافظاً ضد الأعراض من السلالة الشديدة (شكل ٣٨). أما في التجارب التي فيها حقنت النباتات أولاً بالفيروس CSVd أو CEVd ثم بعد ذلك حقنت بالمتحدى ChCMVd كانت غير حاسمة بسبب أن الأعراض الناتجة عن ChCMVd لم يمكن تمييزها إيجابياً عن تلك المتوطدة مسبقاً والأعراض الأكثر شدة من الفيروس CSVd والفيروس CEVd. وبالتالي كما هو ملخص في جدول ٢٢ فإن أفراد المجموعة من الفيروسات التي تشمل السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة من PSTVd والفيروس CEVd والفيروس CSVd، ولكن باستثناء ChCMVd تظهر وقاية بالتضاد في نوع من الأقحوان. هذا يدل على أن السلالة الشديدة والمعتدلة والفيروس CEVd والفيروس CSVd تؤثر على عمليات بيولوجية مشتركة، مع أنها تختلف معنواً من واحد إلى الآخر في التركيب الأولى للأحماض RNAs.

أما الفيروس ChCMVd يبدو أنه لا يؤثر في نفس هذه العملية. ولتحديد فيما إذا كان المتحدى (الفيروس المحقون ثانياً) له تأثير في الوقاية بالتضاد أو يمكن أن يحمي النباتات عن طريق حقنة في النباتات أولاً، فقد تم إجراء اختبارات حيوية في تجريبتين حفظت النباتات عن طريق الحقن المزدوج. في كل حالة فإن كلا الفيروسين حصل له تناسخ. فمثلاً الأعراض النموذجية لكل السلالة الشديدة والفيروس CEVd (أو السلالة المعتدلة والفيروس CEVd) لوحظت بعد الاختبار

الحيوى لمستخلصات الحمض النووى من النباتات المحفوظة والمحقونة مسبقاً بأى من إختادات الفيروسات. إن مستوى التناسخ بواسطة الفيروسات المفردة فى النباتات المحفوظة بالتضاد والمحقونة مرتين تبقى لتحليلها.

خلال التجارب التى استمرت ٦٥ يوم لم يلاحظ إطلاقاً أعراض للفيروس المتحدى المحقون فى نباتات الطماطم المحفوظة. وعلى أية حال، فى الأقحوان، فإن أعراض CEVd المتحدى المحقون لم تكبح بشكل غير محدود عن طريق الحقن المسبق بالسلالة الشديدة أو المعتدلة أو الفيروس CEVd، وإنما بدأت فى الظهور فى هذه النباتات المحفوظة حوالى ٥٠ - ٦٠ يوم بعد الحقن بالمتحدى. هذه النتائج تشبه تلك التى حصل عليها Herrick & Cassells سنة ١٩٧٧ الذى درس الوقاية بالتضاد لسلالات فيروس موزايك الدخان.

لقد تم تفسير ظاهرة الوقاية بالتضاد فى الفيروسات عن طريق تثبيت الإصابة بواسطة المحقون الأول سواء كان فيروس أو فيروس والذى إلى حد ما يؤخر أو يمنع تعبيرات الأعراض عن طريق المتحدى المحقون فيروس أو فيروس، ولا يمكن أن نلغى إمكانية أن مقدار التركيز للفيروس المتحدى مطلوب لتعبيرات الأعراض وأن هذا التركيز لا يصل إليه فى حالة وجود السلالة الواقية كنتيجة للتثبيط الجزئى للتناسخ.

إدخال فيروس ثمرة الخيار الباهتة فى التجربة:

أجريت التجربة السابقة مع إضافة فيروس ثمرة الخيار الباهتة CPFDV فى التجارب على الأقحوان. فتبين أن الأقحوان صنف Bonnie Jean تفاعل مع الإصابة بالفيروس CPFDV بظهور بقع صفراء صغيرة عديدة على حواف الأوراق وقممها.

وقد أظهرت نتائج دراسات الوقاية بالتضاد أنه فقط ChCMV لم يحفظ نباتات الصنف Bonnie Jean ضد الإصابة بأى من الفيروسات الثلاثة الأخرى، ولا أى من هذه الثلاثة فيروسات حفظ هذه النباتات ضد الإصابة بالفيروس ChCMV.

ومن ناحية أخرى فإن النتائج المذكورة في جدول ٢٥ تدل على أن العزلتين PSTVd بالإضافة إلى الفيرويد CSVd و CPFVd حفظت النباتات كل ضد الآخر. الحقن الرجعي للنباتات السليمة Bonnie Jean أكدت النتائج كما هو واضح في الأعراض.

لم يكن بالإمكان رؤية RNA الخاص بالفيرويد ChCMVd على شكل حزمة على الـ Polyacrylamide gels المحمل بمستخلصات من نباتات مصابة بالفيرويد ChCMVd حضرت بواسطة أى من الإجراءات المتبعة في الاستخلاص، مع أن RNAs الخاصة بالنبات اكتشفت في هذه المستخلصات عن طريق الصبغ بمادة Toluidine الزرقاء. إن حزم RNA لثلاثة فيروسات الأخرى كانت دائماً موجودة في وسط الجيل بالضبط فوق حزمة RNA - 9S. مهما كان فإن إجراءات المستخلص كانت تستعمل، أما حزمة RNA - PSTVd - m كانت دائماً الأكثر وضوحاً وكانت حزمة RNA للفيرويد CSVd كانت الأضعف. أما المستخلصات من نبات الأقحوان الصنف المزروع Mistletoe المحقونة بالفيرويد CPFVd لم تكن نقية بدرجة كافية نظراً لأن الجيل المحمل بهذه المستخلصات كانت تصبغ بشكل شامل بالتولويدين الأزرق.

جميع حزم RNA للفيرويدات كانت واقعة على نفس المسافة من قمة الجيل، هذا يدل على أنها لا تختلف في حركتها في الهجرة الكهربائية - Electrophoretic mobility في ١.٥ بولي أكريلاميد جيل. يظهر في جدول ٢٤ أن الفيرويد ChCMVd أصاب نبات الأقحوان فقط من الثلاثة أصناف المزروعة وأحدث أعراض تبرقش الورقة النموذجية على الصنف Deep Ridge وعلى الصنف Bonnie Jean. أما الفيرويدات الثلاثة الأخرى أصابت جميع أنواع النبات المحقونة والمزروعة باستثناء نباتات الخيار صنف Sporu والتي كانت أصيبت فقط بالفيرويد CPFVd. نباتات الخيار المصابة نمت أبطأ من الأفراد السليمة، أوراقها كانت أصغر وشاحبة بأطراف مجعدة لأسفل، أزهارها كانت صغيرة ذات بتلات خضنة مثلثة وكانت ثمارها صغيرة شكل الكمثرى وذات لون أصفر باهت.

جدول ٢٤: تفاعل عدة نباتات إختبار اللغن بأريمة فيرويدات.

التفاعل مع اللغن بالفرويدات					النبات المختبر
ChCMV	CPFVd	CSVd	m- PSTVd	s- PSTVd	
١ - نبات الأقصوان					
ss	ss	ss	ss	ss	صنف Bonnie Jean
ss	ss	ss	ss	ss	صنف Mistletoe
ss	si	si	si	si	صنف Deep Ridge
0	si	ss	si	ss	٢ - <i>Gynura aurantiaca</i>
0	ss	0	0	0	٣ - نبات الخيار صنف Sporu
0	ss	ss	ss	ss	٤ - البطاطس صنف Najwczesniejszy
0	ss	ss	ss	ss	البطاطس صنف New York
0	ss	ss	ss	ss	البطاطس صنف Rutgers
0	ss	ss	ss	ss	٥ - البطاطس صنف Line PW 22/70
0	si	1ss	1ss	1ss	البطاطس صنف Scapolta sinensis

ملاحظات على الجدول: -

1s = أعراض موضعية

ss = أعراض جهازية

si = إصابة جهازية بدون أعراض

0 = بدون إصابة

جدول ٧٥ : نتائج إختبارات الوقاية بالتضاد مع أربعة فيروسات على الأبقوان
صنف Bonnie Jean .

الفيروس الموجود في اللقاح المضاف إلى النبات خلال العفن الثاني	الأعراض الملاحظة على النباتات بعد ستة أسابيع من العفن بالمتحدى	العفن الأول
m - PSTVd	—	m - PSTVd
m - PSTVd	s - PSTVd	m - PSTVd
m - PSTVd	CSVd	m - PSTVd
m - PSTVd	CPFVd	m - PSTVd
m - PSTVd + ChCMVd	ChCMVd	m - PSTVd
s - PSTVd	—	s - PSTVd
s - PSTVd	m - PSTVd	s - PSTVd
s - PSTVd	CSVd	s - PSTVd
s - PSTVd	CPFVd	s - PSTVd
s - PSTVd + ChCMVd	ChCMVd	s - PSTVd
CSVd	—	CSVd
CSVd	m - PSTVd	CSVd
CSVd	s - PSTVd	CSVd
CSVd	CPFVd	CSVd
CSVd + ChCMVd	ChCMVd	CSVd
CPFVd	—	CPFVd
CPFVd	m - PSTVd	CPFVd
CPFVd	s - PSTVd	CPFVd
CPFVd	CSVd	CPFVd
CPFVd + ChCMVd	ChCMVd	CPFVd
ChCMVd	—	ChCMVd
ChCMVd + m - PSTVd	m - PSTVd	ChCMVd
ChCMVd + s - PSTVd	s - PSTVd	ChCMVd
ChCMVd + CSVd	CSVd	ChCMVd
ChCMVd + CPFVd	CPFVd	ChCMVd
m - PSTVd	m - PSTVd	none
s - PSTVd	s - PSTVd	none
CSVd	CSVd	none
CPFVd	CPFVd	none
ChCMVd	ChCMVd	none

خامساً: التداخل بين الفيرويدات المحقونة معاً:

Interference Between Coinoculated Viroids

أظهرت الدراسات المتأخرة أن الوقاية بالتضاد Cross - Protection تحدث في الفيرويدات ليس فقط بين سلالتين لفيرويد معين (التي لا تختلف في تنابعها الأساسي بأكثر من ١٠٪) ولكنها تحدث أيضاً بين الفيرويدات المختلفة وهذا أدى إلى إجراء تجارب كثيرة في هذا المجال.

في إختبارات الوقاية بالتضاد الكلاسيكية يكون هناك مدة أسبوعين بين الحقن بالفيرويد الأول والحقن بالفيرويد المتحدى. وحيث أن ظاهرة الوقاية بالتضاد تقترح بأن وجود فيرويد واحد يمكن أن يتدخل مباشرة مع عملية تناسخ الفيرويد الثاني، وبالتالي فإن هذا يصعب تقديره بعد فترة طويلة لأن فترة أسبوعين بين الحقن بالفيرويد الأول والفيرويد الثاني تسمح بحدوث تأثيرات ثانوية أخرى. وبالتالي فإن هناك مجموعتين من التجارب لتحديد فيما إذا كان التداخل يمكن أن يلاحظ بين الفيرويدات الداخلة في النبات وكأنه لقاح واحد مخلوط من الفيرويدات.

عند البحث عن التداخل بين سلالة معتدلة من فيرويد الدرنه المغزلية في البطاطس PSTVd - m وسلالة شديدة PSTVd - s. حقنت باحرات طماطم ذات عمر ١٤ يوم بكل من السلالتين على حدة ومرة ثانية بالسلالتين معاً. بعد ١٠ أسابيع أخذت ملاحظات وصور عن هذه النباتات. خلال فترة العشرة أسابيع هذه استعملت طريقتان لتقدير تعبيرات الأعراض للفيرويد PSTVd. حدد طول كل نبات أسبوعياً بواسطة قياس طول الساق حتى القمة المرستيمية. بالإضافة إلى ذلك استعمل نظام تدريج عددي واستعمل ثلاثة مرات في الأسبوع ليسجل التغيرات غير العادية في الشكل الظاهري، مثل تشوه الأوراق، النموات الزائدة للسيقان

ملاحظة هذه التجربة قام بها إتي عشر باحثاً في جامعة روكفلر في أمريكا سنة ١٩٨٨ وكان على رأس هذا الفريق من الباحثين العالم ANDREA D.Branch. وهي تعرض هنا باختصار كبير.

المحورية، الشحوب، التبقع والموت والتقرم، هذا يعنى خفض المسافة بين السلاميات. التقديرات الممكنة على هذا المدرج تتراوح من صفر إلى خمسة. إن مقدار ٢ أو أكثر يدل على أعراض شديدة تدل على مرض فيريدي شديد. هذه التجربة أجريت مرتين، باستعمال مجموعات معاملة تحتوى أربعة نباتات فى كل الأوقات. حصل على نتائج عالية التناسق ودرست المعلومات المتحصل عليها.

النباتات التى أعطيت لقاح مخلوط يحتوى ٠,٢ ميكوغرام لكل ملتر من السلالة المعتدلة من فيريود الدرة المغزلية فى البطاطس و ٠,٢ ميكوغرام لكل ملتر من السلالة الشديدة من نفس الفيريود كانت نتائجها من حيث منحى النمو والأعراض الجانبية مطابقة لتلك النباتات المحقونة بكمية ٠,٢ ميكوغرام لكل ملتر من السلالة الشديدة لنفس الفيريود لوحدها. هذا يدل على إخفاق للسلالة المعتدلة فى أن تقلل التعبير المرضية للأعراض المتسببة عن السلالة الشديدة أما النباتات المحقونة بكمية ٠,٢ ميكوغرام لكل ملتر من السلالة المعتدلة نمت بسرعة أكثر ووصلت إلى طور نهائى أكبر من النباتات المحقونة إما بمخلوط من السلالة المعتدلة والشديدة معاً أو السلالة الشديدة لوحدها. وعلى كل حال فإن النباتات المحقونة بالسلالة المعتدلة يمكن أن تميز عن النباتات المحقونة بالكنترول على أساس الارتفاع وعلامات الشكل الظاهرى. النباتات المحقونة بعشرة أضعاف زيادة من السلالة المعتدلة فوق السلالة الشديدة (٠,٢ ميكوغرام لكل ملتر من السلالة المعتدلة و ٠,٠٢ ميكوغرام لكل ملتر من السلالة الشديدة) كانت غير مميزة عن النباتات المحقونة بالسلالة الشديدة بتركيز ٠,٠٢ ميكوغرام لكل ملتر. وبالتالي حتى عندما يكون اللقاح محتوياً عشرة أضعاف زيادة من السلالة المعتدلة فإن العزلة الشديدة كانت سائدة سيادة كاملة على مستوى التعبير العرضى للمرض.

وعلى النقيض من ذلك فإن النباتات المحقونة بمائة ضعف زيادة من السلالة المعتدلة نمت إلى معدل ارتفاع أكثر قليلاً من المجموعة المشابهة المحقونة بالسلالة الشديدة لوحدها، هذه الزيادة لوحظت فقط فى فردين من المجموعة. نفس هذين

النباتين أظهرتا أعراض معتدلة فقط خلال العشرة أسابيع فى فترة بعد الحقن. وعلى أية حال فى ٧٥٪ من النباتات فإن أعراضاً غير مخفضة من المرض الشديد قد نتجت على الرغم من زيادة مائة ضعف من اللقاح من RNA من العزلة المعتدلة لا يوجد أى دليل على أن السلالة الشديدة والمعتدلة تسبب تأثيرات إضافية عند حقنهما معاً فى النباتات.

الجرعة المطلوبة لتعبيرات الأعراض:

هل من الممكن أن تلك الأعراض سوف تختلف ليس فقط مع السلالة ولكن أيضاً مع جرعة اللقاح؟. للإجابة على هذا السؤال فإن مجموعات من النباتات الكنترول حقنت إما بالسلالة المعتدلة من فيروس الدرة المغزلية فى البطاطس لوحدها (بتركيز ٠,٠٤, ٠,٠٢, ٠,٠٢ و ٠,٠٠٢ ميكروغرام / ملتر) أو بالسلالة الشديدة لوحدها (فوق نفس المستوى المستوى من التركيز) ثم وضعت تحت المراقبة لمدة عشرة أسابيع. وجد أن الوقت اللازم لبداء ظهور الأعراض الفيروسية النموذجية يتناسب عكسياً مع تركيز اللقاح. وعلى أية حال فإن هذا التأثير الذى كان أكثر وضوحاً خلال أول أسبوعين بعد الحقن لم يستمر. بمضى عشرة أسابيع بعد الحقن فإن جميع المجموعات النباتية المحقونة بالسلالة المعتدلة مطابقة تماماً لبعضها البعض بغض النظر عن التركيزات التى استعمل فيها اللقاح، سواء حقنت بتركيز ٠,٠٤ ميكروغرام لكل ملتر أو ٠,٠٢ ميكروغرام لكل ملتر فهى تعبر عن نفس المستوى من أعراض السلالة المعتدلة وكانت كلها أقصر قليلاً من نباتات الكنترول المحقونة بالمنظم. وبالمثل فإن النباتات المحقونة بتركيز ٠,٠٠٢ ميكروغرام لكل ملتر من السلالة الشديدة أظهرت نفس الخفض العنيف فى الدرجة وحصلت على نفس الأعراض مقدرة مثل تلك المحقونة بتركيز ٠,٠٤ ميكروغرام. فى كل حالة فإن الأعراض الخاصة المميزة للسلالة وجد أنها تتكشف فى النباتات المحقونة بمدى جرعات من الفيروس متفاوتة وإن إختلاف التركيز فى الحقن يظهر تأثير فى أول ٧٠ يوم ثم بعد ذلك لا يعود لاختلاف التركيز أى أثر على الأعراض.

تنشيط تناسخ فيرويد تقزم حشيشة الدينار بعد الحقن المشترك
بفيرويد PSTVd :

نظراً لأن عزلات الفيرويد تحدث طبيعياً، مثل العزلة المعتدلة والشديدة لفيرويد
الدرة المغزلية في البطاطس، فإنها يمكن أن تحتوى خليطاً من تنوعات التتابع. إن
هذه الدراسة إمتداداً للدراسة السابقة وذلك لمقارنة كفاءة التناسخ في النباتات المحقونة
بنسخ من تتابع فيرويد مكلون. هذه النسخ ممكن أن تزود بلقاح يحتوى تتابعات
نقية مفردة.

لقد إختير فيرويد تقزم حشيشة الدينار HSVd وفيرويد الدرة المغزلية في
البطاطس PSTVd لهذه التجربة لعدة أسباب منها:-

- ١ - هذان الفيرويدان يحدثان أعراضاً مختلفة جداً في نباتات الطماطم.
- ٢ - الإصابة بفيرويد تقزم حشيشة الدينار تسبب أعراضاً غير ظاهرة في
البطاطس بينما فيرويد الدرة المغزلية الهولندية يسبب أعراضاً شديدة جداً
تحت ظروف النمو المستعملة في التجربة.
- ٣ - نظراً لأن الفيرويديين يمتلكين تماثل تتابع محدود فقط فمن الممكن
تمييزهما بطريقة تهجين الحمض النووي.
- ٤ - إن نسخ ال Dimeric من HSVd و PSTVd قد تبين أنها معدية في نباتات
الخيار والطماطم بالترتيب.

لإختبار نسخ ال HSVd dimeric على نباتات الطماطم، فإن cDNA inserts
كانت قد تحركت أولاً في ناقلات التعبير pSP6. إثنان من البلازميد مختلفان كل
من تكرار ترادفي رأس مع ذيل من HSVd cDNA ركبت في pSP6 واحداً
يستعمل موقع Eco R1 الموجود في HSVd DNA والآخر مستعملاً مواقع
Bam H1. النسخ من هذه البلازميدات يشار إليها HSD3 و BH2 بالترتيب

تحتوى HSVd dimers من القطبية الموجبة محاطة جانبياً بمناطق قصيرة من تتابعات الناقل.

إن تهجين الحمض النووي قد بين أن تناسخ HSVd يحدث في نباتات الطماطم المحقونة بكل من النسخين HSVd dimeric. وعلى أية حال كما هو متوقع فإن هذه النباتات لم يتكشف عليها أية أعراض يعرف عليها. إن نسخة الـ PSTVd 8A قد أظهرت في تجارب سابقة أنها معدية لنباتات الطماطم، هذا يكون باعثاً على نضج الـ PSTVd RNA الدائري لتتابع الهولندي. إن الحقن بـ 8A أنتج أعراضاً مميزة لمرض فيروسى شديد. المقارنة بـ dot intensities بين أن نباتات الطماطم المصابة بفيروس PSTVd يتجمع فيها على الأقل ٥٠ ضعف من RNA الفيروسي أكثر منه في نباتات الطماطم المحقونة بفيروس HSVd.

هناك إجراءان مختلفان إستعملتا للحقن المشترك للنباتات بفيروس HSVd وفيروس PSTVd. في تصميم مشابه لذلك المستعمل في دراسة السلالة المعتدلة والشديدة في فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس فإن نسخاً من الـ Dimeric HSVd و PSTVd خلطت مع بعضها بمعدلات مختلفة وحقنت في بادرات الطماطم. في التجربة الثانية، فإن نسخاً مزدوجة حضرت والتي تحتوى صورتين (نسختين) من الـ PSTVd إرتبطت مع صورتين من HSVd. هذه النسخة BPH 21 ضمنت إضافة التتابعات من HSVd و PSTVd بتركيزات متساوية. كانت النتائج من كلا التجريبتين متشابهة بغض النظر عن التصميم. إن وجود الـ PSTVd كان مقترناً بخفض ملحوظ في تناسخ الـ HSVd.

في تجارب أولية للتنافس بين HSVd و PSTVd فإن نسخاً من HSD₃ و 8A خلطت بمعدلات بنسبة تتراوح من ١ : ١٠٠ إلى ١ : ١. النباتات التي تحصل على نفس اللقاح كانت تعامل كمجموعة. بالمقارنة مع عينات من النباتات حقنت بنسخاً من HSVd لوحده، فإن التركيز من HSVd كان يخفض بالتدرج في الأحماض النووية من النباتات المحقونة بـ HSVd و PSTVd بنسبة ١ : ١. لوحظ بعض الخفض في HSVd في مستخلصات من النباتات حقنت بمشرة

أضعاف زيادة من نسخ HSVd، بينما نسخ ال PSTVd لم يكن لها تأثير مكتشف على التجمع في النباتات المحقونة بمائة ضعف زيادة من نسخ HSVd.

لتحديد فيما إذا كان المستوى المنخفض من HSVd عاكساً عدم المقدرة النسبية على نسخ ال HSVd لتدخل خلايا الطماطم في الوقت الذي عنده يضاف اللقاح، النباتات كانت أيضاً محقونة بنسخة مزدوجة (BPH 21) محوية صورياً مرتبطة من ال Dimeric لكل من HSVd و PSTVd. وعلى أية حال فإن تناسخ HSVd لم يثبت في النباتات التي أخذت هذه النسخة. في الحقيقة، فإن سبعة أسابيع بعد الحقن خلالها لم يمكن اكتشاف HSVd في الساق ومستخلصات الورقة في هذه النباتات. في التجارب اللاحقة فإن محتويات الفيرويد في النباتات المفردة كانت قد تحددت.

إن طريقة Dot hybridization أظهرت أن واحداً فقط من ثمانية نباتات يتجمع فيها مستويات يمكن التعرف عليها من HSVd RNA عندما حقنت بمخلوط محتوي ٢٠ ميكوغرام لكل ملتر من HSD₃ و ٢,٠ ميكوغرام لكل ملتر من نسخ Dimeric PSTVd. ومن ناحية أخرى فإن ثلاثة من أربعة نباتات تنسخ HSVd عندما حقنت بـ HSD₃.

إن كفاءة ال PSTVd في وقف تناسخ ال HSVd كان أيضاً مؤكداً في النباتات المحقونة بمقدار ٤٠ ميكوغرام لكل ملتر من النسخة المزدوجة، BPH 21. هذه النباتات أظهرت أعراض مرض شديدة يتعذر تمييزها عن تلك الناتجة بواسطة الحقن بنسخة ال PSTVd لوحدها. إن الفيرويد PSTVd يتجمع في الخمسة نباتات كلها، بينما HSVd لم يمكن اكتشافه في أى منها. إن النسخة من HSVd dimer-ic أكثر تشابهاً للنسخة المزدوجة التي تسمى BH₂. هذه النسخة تصيب ثلاثة من خمسة نباتات عندما حقنت بمقدار ٢٠ ميكوغرام لكل ملتر. كذلك فإن BH₂ تصيب ثلاثة من خمسة نباتات عندما حقنت بمقدار ٥٠ ميكوغرام لكل ملتر. إن إصابة ٦ من ١٠ نباتات طماطم محقونة بمقدار ٢٠ - ٥٠ ميكوغرام لكل ملتر من BH₂ أدى إلى الاقتراح بشدة بأن HSVd فشل في التناسخ في النباتات المحقونة بنسخة مزدوجة من BPH 21 بسبب التداخل من PSTVd.

يمكن القول باختصار بأن هذه التجربة قد أظهرت أن نسخاً من PSTVd قد خفضت بشكل كبير جداً حيوية نسخ HSVd. إن طريقة Dot hybridization قد أظهرت أن الفيروس PSTVd فقط هو الذى يتضاعف وينسخ إلى مستويات يمكن اكتشافها فى النباتات المحقونة بنسخ مزدوجة تحتوى نسختين من PSTVd متبوعة بنسختين من HSVd. بينما النسخ المزدوجة التى فيها HSVd تتابعه يسبق تلك التى فى PSTVd التى تحتاج إلى الاختبار. لقد تبين أن نسخ HSVd تكون معدية عندما تحاط بمدى واسع من التتابعات المختلفة. ويبدو أن HSVd يفشل فى التضاعف عندما يحقن مشتركاً مع PSTVd فى النباتات بسبب التداخل الواضح من PSTVd.

هناك سؤالاً نحتاج إلى الإجابة عليه مستقبلاً وهو هل الفيروسات الشديدة المرضية تستطيع أن توقف تناسخ الفيروسات الأقل شدة مرضية؟؟

إن تجارب الحقن المشترك تختلف عن تجارب الوقاية بالتضاد Cross - Protection والتى فيها إحدى الفيروسات يدخل النبات قبل الآخر بمدة معينة. إذا كان تناسخ الفيروس يؤدي إلى تكوين تركيب معقد دائم فإن هذا التركيب يكون منافساً للفيروس الثانى الذى يدخل متأخراً. أما فى تجارب الحقن المشترك فإن الفيروسين يدخلان معاً مما يسمح لهما بفرصة متساوية، هذه الأوضاع تجعل الفيروس الشديد يكون عنده فرصة كبيرة لتكوين معقد بغض النظر عن وجود الفيروس الضعيف.

لقد وجد أن تناسخ PSTVd فى النباتات الحساسة جداً للبرد والتى تنمو على درجة أقل من ٢٤°م يكون قليل جداً مما يؤدي إلى تثبيط واضح فى الأعراض المرضية وفى تراكم الفيروس فى النبات. كذلك فإن مستويات HSVd فى نباتات الطماطم النامية فى نفس درجات الحرارة كان أقل منه فى PSTVd. وأن طرق التحاليل المختلفة أثبتت أن مستويات HSVd لا تزيد عن ٢٪ من مستوى PSTVd. إن الاختلاف فى هذا المستوى يؤدي إلى الاختلاف فى إظهار الأعراض المرضية على نباتات الطماطم.

مراجع خاصة بالفصل الرابع

- 1 - Bachmann, B., Luke, W. and Hunsmann, G. 1990. Nucleic Acid Res. 18 : 1309.
- 2 - Cassells, A. C. and Herrick, C.C. 1977. Virology 78 : 253 - 260.
- 3 - Fernow, K. H. 1967. Phytopathology 57 : 1347 - 1352.
- 4 - Hecker, R. et al. 1988. Gene 72. 59 - 74.
- 5 - Loss, P., Schmitz, M., Steger, G. and Riesner, D. 1991. EMBO J. 10 : 719 - 727.
- 6 - Matousek, J, Trnena, L. Rakousky, S. ad Riesner, D. 1994. J. Phytopa., 140 : 10 - 24.
- 7 - Mellor, F. C. and R. Stace - Smith. 1977. Applied and Fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer Verlag, Berlin.
- 8 - Melton, D. A. et al 1984. Nucl. Acids. Res. 12 : 7045 - 7056.
- 9 - McKinney, H. H. 1929. I. Agric. Res. 39 : 557 - 578.
- 10 - Palukaitis, P. 1987. Virology, 158 : 239 - 241.
- 11 - Riesner, D. et al. 1989. Electrophoresis 10, 377 - 389.
- 12 - ———, ———, ———. 1990. New Series in biophysics. Nucleic Acids Vol IV PP. 194 - 243.
- 13 - Steger, G. et al. 1992. J. Mol. Biol. 227 : 719 - 737.
- 14 - Tsagris, M., Tabler, M. ad Sanger, H. L. 1991. Nucleic Acid Res. 19 : 1605 - 1612.
- 15 - Wassengger, W. J. et al. 1994. Cell. 76 : 267 - 276.

الجزء الثاني

الأمراض الفيرويدية

Viroid Diseases

الفصل الخامس

الأمراض الفيروسية المنتسبة عن مجموعة PSTVd

فيروسات من تحت مجموعة PSTVd B₁

١ - فيروس الدرنّة المغزلية في البطاطس - مرض الدرنّة المغزلية في البطاطس

Potato spindle tuber viroid

ينتشر مرض الدرنّة المغزلية في البطاطس في كل من الولايات المتحدة الأمريكية، كندا، روسيا، جنوب أفريقيا، الهند وأستراليا. يسبب المرض خسائر كبيرة في بعض المناطق ويعتبر أحد أكثر الأمراض المهلكة للبطاطس. يهاجم المرض معظم الأصناف وينتشر بسرعة وفي كثير من الحالات يكون مترافقا مع بعض الأمراض الفيروسية. يهاجم المرض الطماطم ولكن يبدو (إقتصاديا) أنه ذو أهمية قليلة على محصول الطماطم.

الأعراض:

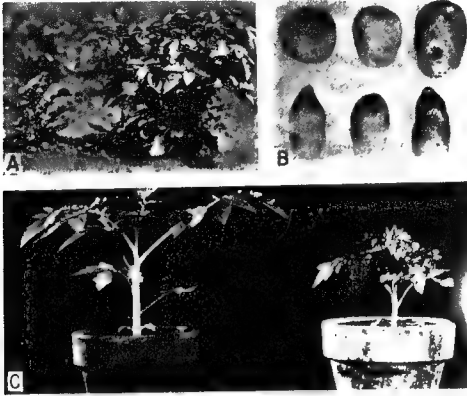
تظهر نباتات البطاطس قائمة ومتمزجة، الأوراق والفروع الجانبية تنمو على زاوية حادة، قواعد الأوراق تكون منحنية كالمنجل ويلاحظ تكوّن حواف ونصل الورقة. تكون الأوراق صغيرة وقائمة والوريقات تكون ذات لون أخضر غامق وأحيانا يظهر عليها إلتفاف والتواء (شكل ٣٩).

تكون الدرنات متطاولة ذات شكل مغزلي نموذجي أو تأخذ شكل المضرب doil - Shaped، أحياناً تكون الدرنات ذات منتصف أسطواني ونهايات وتدية وتكون الدرنات أكثر نعومة وذات جلد أكثر ضعفاً وتشقق أحياناً وتكون ذات لحم رفيف طرى. تكون عيون الدرة أكثر عدداً وأكثر وضوحاً إلا أنها تكون منخفضة قليلاً، تكون الدرنات مشوهة. ينخفض الانتاج إلى حد كبير يصل ٢٥ ٪ فأكثر، ينخفض عدد وحجم الدرنات الناجمة كثيراً، بعض النباتات لا تعطي درنات أبداً.

أما نباتات الطماطم القابلة للإصابة فتكون متقزمة وتتدلى الأوراق وتكون ذات عروق غائرة أكثر منه في الحالة الطبيعية مع وجود نكروزز (موت وتحلل الأنسجة) في الأعناق والعروق ونصل الورقة. تكون نباتات الطماطم المصابة ذات قمة متوردة.

تكون الأعراض أكثر وضوحاً وشدة عندما تنتج عن السلالة الشديدة. كذلك تكون الأعراض أكثر وضوحاً في طور الإصابة الثاني (الإصابة الثانوية) حيث تلتهب الأوراق السفلى أحياناً. في بعض الظروف الجوية وفي بعض الأصناف تكون الأعراض الناجمة عن الإصابة بالسلالة الشديدة شبيهة لتلك المتسببة عن السلالة المعتدلة، ولكن أعراض السلالة الشديدة تتميز بوضوحها وشدة إنتشارها.

إختبر نشاط أنزيمات الببتايديز في نباتات الطماطم السليمة والمصابة بالفيرويد PSTVd فوجد أن Leu - P - nitroanilide كانت حوالى ثلاثة أضعاف نشاطها وسبعة أضعاف كميتها في النباتات المصابة عنها في النباتات السليمة وإن كمية الأملاح، الكبريت، الكلور، الكالسيوم، الزنك والمغنيز أعلى في النباتات المصابة عنها في السليمة أما المغنيسيوم والنحاس والفسفور والالنيوم والسلكون فلم تتأثر بالإصابة.



شكل رقم ٣٩ :

أعراض متسببة بواسطة فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس- (A) نباتات بطاطس مريضة على الشمال متقزمة ونموها قالم. (B) درنات مريضة، فى الأسفل مغزلية الشكل وصغيرة مقارنة بالدرنات السليمة العلوية. (C) نباتات طماطم على الشمال سليمة وعلى اليمين مريضة بعد عشرون يوم من الحقن بفيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس.

الكائن الممرض :

يتسبب هذا المرض عن فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس-Potato Spindle Tu ber Viroid ويكتب باختصار (PSTVd) وقبل سنة ١٩٩٣ كان يكتب (PSTV)، إلا أن علماء الفيروسات إتفقوا على إضافة حرف (d) وذلك لتمييزه عن الفيروسات حيث أن الفيروسات المكتشفة أصبحت كثيرة. تصنيف الفيروسات المذكور فى الجزء الأول من الكتاب.

هذا الفيرويد هو أول فيرويد عرف وحددت نيوكليتيدهاته وقد درس دراسة وافية جداً وإن جميع دراسات الفيرويدات كانت تطبق على هذا الفيرويد. إبتدأت الأبحاث على هذا الفيرويد من قبل العالم Diener سنة ١٩٧١ حيث أن العالم Diener هو الأب الروحي لعلماء الفيرويد وإن فيرويد PSTVd هو الأب الروحي في دراسات الفيرويدات كلها.

الفيرويد هو RNA معدى وهو ذو وزن جزيئى منخفض حوالى ١٠٠٠٠٠ دالتون. إن RNA لهذا الفيرويد يتكون من ٣٥٩ نيوكليتيده (ذكر بعض العلماء أن سلاطات من هذا الفيرويد تكون ٣٥٦ وسلاطات أخرى ٣٦١) به عديد من القواعد المزدوجة. يتكون الفيرويد من خيط مفرد من RNA مستقيم أو دائرى. يظهر الفيرويد النقى بتصوير الميكروسكوب الالكترونى على شكل خيط قصير طوله ٥٠ نانوميتر وله سمك يماثل سمك DNA مزدوج الخيط (شكل رقم ١ فى الجزء الأول من الكتاب).

تبقى العصارة المأخوذة من النباتات المصابة قادرة على إحداث العدوى بعد تخفيف ١ : ١٠٠ و ١ : ١٠٠٠. وكذلك يحتفظ بحيويته عند تسخين المستخلص النباتى لمدة عشرة دقائق على ٧٥ - ٨٠ م. إن الفيرويد سريع التثبيت فى العصارة المستخلصة من النباتات المصابة، ولكن يمكن إبقاء قدرته على إحداث العدوى عن طريق معاملة العصارة بالفينول حيث أن الفينول يثبط نشاط أنزيم Ribonuclease الذى يحطم RNA الفيريدي.

الانتقال :

ينتقل الفيرويد ميكانيكياً وينتشر بشكل أساسى بواسطة السكاكين المستعملة فى تقطيع التقاوى للبطاطس السليمة والمصابة، وأثناء العمليات الزراعية وطرق الجمع. كذلك ينتقل الفيرويد عن طريق حبوب اللقاح والبذور الحقيقية وعن طريق عديد من الحشرات من ضمنها المن، نطاطات الأعشاب. يبدو أن النقل بالحشرات غير أساسى لهذا الفيرويد.

أشكال الفيرويد PSTVd :

كما هو معروف فإن الفيرويدات هي مخلوقات ممرضة ذات وزن جزيئى منخفض تتكون من جزيء RNA دائرى مغلق احادى الخيط. إن لفيرويد الدرة المغزلية فى البطاطس شكلان الأول مستقيم والثانى دائرى. أفادت كثير من الأبحاث بأن الشكل المستقيم من RNA الفيرويدى له نفس العدوى التى تسبب عن الشكل الدائرى من RNA الفيرويدى. ووجد أيضاً أن الشكل المستقيم له نبات أقل منه فى الجزيئات الدائرية. كذلك فإن الأشكال المستقيمة تحتوى-5' Phos- phosphate وبالتالى فإن كثيراً منها لم تكن منتجة بواسطة أيونات معدنية كعامل مساعد للهدرولسز من الجزيئات الدائرية. والشكل المستقيم يتكون من تجمع يحتوى أى واحدة من أربعة نيوكليوتيدات على نهايتها 5'. مثل هذه المعلومات تدل على أن الجزيئات المستقيمة الطبيعية لم تنتج بواسطة إنشطار الجزيئات الدائرية عند موقع نيوكليوتيدة محدد، ولكن يمكن أن تنتج إما بواسطة الإنشطار العشوائى أو بواسطة الإنشطار ضمن مناطق خاصة فى الجزيء الدائرى مختلف القابلية لأنزيم Nuclease.

لقد عزلت الأشكال الدائرية والمستقيمة من هذا الفيرويد ونقيت من نسيج نبات طماطم مصاب بالفيرويد PSTVd وإن كلا الشكلين فى حد ذاتهما لم يمكن تمييزهما بالميكروسكوب الألكترونى ولكن إلى حد ما يمكن تمييزهما عن طريق electrophoretic mobilities على Denaturing Polyacrylamide gels وعن طريق مقدرة الشكل المستقيم وليس الدائرى بأن يحدث له فسفرة على موقع نهاية 5' بواسطة (P³² - ٥) ATP و Polynucleotide Kinase - T₄. ولقد أمكن إثبات أن الفيرويد PSTVd يمتلك هذين الشكلين أيضاً عن طريق تحليلات التهجين والحيوية. ويبين جدول رقم ٢٦ أن كلا الشكلين من الفيرويد لهما نفس الحيوية والكفاءة فى إصابة نباتات الطماطم وكذلك لهما أيضاً نفس الحيوية فى إصابة *Gynura aurantiaca*.

جدول ٢٦: يبين حيوية الشكل المستقيم والدائري للفيروس PSTVd على نباتات الطماطم.

شكل الفيروس المختبر	عدد النباتات التي يظهر عليها أعراض على عدد النباتات المحقونة بتركيز من RNA نانوغرام / ملتر							
	٥٠	١٠	٥	١	٠,٥	٠,١	٠,٠١	
فيروس دائري	5/5	4/4	5/5	3/5	2/5	1/5	1/5	-
فيروس مستقيم	5/5	2/3	3/5	2/5	3/5	1/5	0/5	-
فيروس دائري	-	6/6	-	3/6	-	0/5	0/5	0/6
فيروس مستقيم	-	6/6	-	3/6	-	0/5	0/5	0/6

من الأبحاث المتلاحقة والمتكررة في هذا الموضوع تبين أن الشكل المستقيم للفيروس من المحتمل أن يكون مرتبطاً في الطبيعة مع الشكل الدائري وأن عملية الربط هذه تكون فعالة نسبياً. أجريت دراسات كثيرة لمعرفة تأثير الطرق المختلفة في تحضير الفيروس واستخلاصه على تكوين الشكل المستقيم للفيروس. ونظراً لأن كلا الشكلين الدائري والمستقيم قد وجدا في الأنسجة المستخلصة بأي طريقة من طرق الاستخلاص الأربعة، فإن هذا يدل على أن الأشكال المستقيمة توجد بذاتها وأن وجودها لم يكن صناعياً نتج من تأثير أى واحد من تلك الإجراءات. زيادة على ذلك فإن وجود الأشكال المستقيمة لم يكن معتمداً على نوع العائل الذي يتنامخ فيه الفيروس ولا على طول المدة التي يبقى فيها النسيج مصاب ولا على استعمال سلالة معينة من PSTVd في اللقاح. ولقد تبين أن الشكل المستقيم يزداد تجمعاً في الأنسجة بزيادة وقت التحضين ويصبح مساوياً لمستويات الشكل الدائري من الفيروس بعد ٢٤ ساعة من التحضين. يلاحظ ذلك في جدول ٢٧.

جدول ٢٧ : تأثير طول مدة التحضين على تجمع الشكل الدائري والمستقيم من فيروس PSTVd في خلايا نسيج نبات البطاطس.

طول فترة التحضين بالمسحور المشع	% شكل دائري	% شكل مستقيم
٤ ساعة	٧٧	٢٣
١٢ ساعة	٦٥	٣٥
٢٤ ساعة	٤٦	٥٤

وهناك تجارب تدل نتائجها على أن جزيئات الشكل الدائري والمستقيم كل منها يبقى منفرداً أو أن جزيئات الشكل الدائري تبنى أولاً ثم بعد ذلك تتجمع جزيئات الشكل المستقيم كنتيجة لإنشطار الجزيئات الدائرية، ولكن على أية حال فإن المستوى الكلى للشكل المستقيم نادراً ما يساوى مستوى الشكل الدائري ولا يكون أعلى منه. عند استعمال أنزيم RNA ligase يمكن أن يحدث توازن بين المستويين.

ولقد ثبت أيضاً بأن معظم الجزيئات المكونة لتجمعات الشكل المستقيم ليست هي الفيروس المستقيم طبيعياً ولكنها ناتجة من الإنشطار الدائري من أشكال الـ multimeric على مواقع محددة وتتجمع قبل أن يتم اللحام إلى أشكال دائرية. هناك مستوى منخفض من النسبة المثوبة لـ G- ومستوى على من U في الشكل المستقيم.

هناك عدة ملاحظات تدل على أنه ليست عروة اليد اليمنى هي الموقع الفريد للإنشطار ذلك للأسباب الآتية:-

١ - هناك ٧٧٪ من جزيئات الشكل المستقيم تحتوي 5'- terminal G residue.

هذه النيوكليتيده ليست موجودة فى عروة اليد اليمنى من الشكل الدائرى.

٢ - إن عدداً من ال minor spot موجودة فى طريقة تحليل بصمة الإصبع فى الشكل المستقيم وغير موجودة فى الشكل الدائرى.

٣ - الخمسة بقع التى تمثل عروة اليد اليمنى من الفيرويد (بصمة الإصبع) تظهر معلمة بدرجة عالية أكثر مما يتوقعه الباحث أن توجد فى الجزئيات المتشكلة بواسطة الإنشطار العشوائى.

٤ - عند التحليل فإن البقع المتعلقة بمجموعة النيوكليتيديات القصيرة أو الطويلة والتى من المتوقع أن تكون ضمن عروة اليد اليمنى التى فى أجزاء من RNase T₁ تكون غير واضحة فى التحليل.

٥ - إن الأجزاء المحتوية RNase T₁ فى ذراع اليد اليمنى والعروة تكون موجودة فى بصمة الإصبع للشكل المستقيم.

يمكن القول بأن نهاية ساق اليد اليمنى وعروة الشكل الدائرى تحتوى تنابع يشبه تنابع بروجين rDNA. وبالتالي يمكن القول بأن RNA Polymerase I المعتمد على DNA يمكن أن يتدخل فى بناء الفيرويد.

هناك مواقع أخرى للإنشطار فى PSTVd حددت بتفاعلات كثيرة وتبين أن مواقع الإنشطار هى ١٧٧ - ١٨٢، ١١٣ - ١١٤، ٨٠ - ٨١، ٣٣٤ - ٣٤٠، ٣٠٠ - ٣١٢، ٢٧١ - ٢٧٥.

حركة المصيب فى النبات:

إن ظاهرة إنتقال الفيروسات مسافة طويلة خلال اللحاء فى النباتات المصابة قد درست بتعمق ولقد تأكد بأنها عملية موجبة تقع فعلاً. أما ظاهرة إنتقال

الفيروسيدات لمسافة طويلة فى النباتات المصابة هى أيضاً تكون خلال اللحاء، مع أن هذا الموضوع قد حصل على قليل من الاهتمام.

كما نعرف فإن الفيروسيدات هى جزيئات من RNA معدية ذات وزن جزيئى منخفض أحادية الخيط مكونة دوائر مغلقة ذات درجة عالية من تزاوج القواعد الداخلية. ولقد وجد أن هذه الفيروسيدات تتحرك من الساق المحقون أو الورقة المحقونة إلى المناطق المرستيمية فى النبات، عندئذ تكون الخلايا فى جميع الأوراق الحديثة أصبحت مصابة خلال تكشفها.

فى هذا المجال أجريت تجارب على إنتقال الفيروس PSTVd لتحديد سيره فى نباتات الطماطم وتبين أن الفيروس يتحرك لمسافة طويلة عن طريق اللحاء وبالتالي فإنه يشابه فى هذا المجال حركة الفيروس.

عند الحصول على مستخلص حمض نووى منقى جزيئاً من نباتات طماطم مصابة بالفيروس PSTVd ثم يخفف فى ١،٠ مول Na_2HPO_4 ثم يحقن (فى أعلى وريقة من الساق) لأول ورقة حقيقية من أوراق بادرات الطماطم ثم تحضن النباتات على درجة ٣٠°م ثم يكشف عن وجود الفيروس على فترات متباعدة فى أجزاء مختلفة من النبات بطريقة Dot - blot - hybridization.

ولقد تبين أن الفيروس PSTVd يمكن أن يكتشف أولاً فى قمم الأفرع وفى ورقة فوق الورقتين اللتين تقعان فوق الورقة المحقونة وذلك بعد سبعة أيام من الحقن. وفى تجربة أخرى حيث الأوراق إختبرت للكشف عن الفيروس بعد ٣، ٦، ٩ و ١٢ يوم من الحقن، فقد أمكن اكتشاف الفيروس فى القمم بعد ستة أيام من الحقن. ومن المهم أن نذكر هنا أن الورقة الواقعة فوق الورقتين اللتين تقعان فوق الورقة المحقونة أصبحت جزء من قمة الفرع فى النبات بعد ١ - ٤ أيام من الحقن. وبالتالي فإن الفيروس PSTVd يتضاعف إلى مستوى يمكن اكتشافه فى القمة أكثر منه فى الأوراق الأخرى. بعد ١١ يوم من الحقن يمكن اكتشاف الفيروس فى

الورقة الموجودة فوق الورقة المحقونة. وبعد ٢ - ٤ أسابيع يمكن أن يكتشف في الورقة المحقونة نفسها. لقد سبب الفيرويد ظهور أعراض في نباتات الطماطم بعد أسبوعين من الحقن. إن الوريقات المحقونة لم تختبر روتينياً لأن اللقاح المتبقى في الوريقات يمكن أن يكتشف بعد خمسة أيام من الحقن. وبعد ثلاثة أسابيع من الحقن أمكن اكتشاف الفيرويد في جميع الوريقات في الورقة المحقونة.

إن إنتشار الفيرويد PSTVd في أوراق بادرات الطماطم المحقونة (ثلاثة إلى أربعة طور ورقى) قد تمحدد بعد شهر من الحقن. النباتات التي فيها الورقة الثالثة فوق الفلقات كانت قد حقنت أظهرت وجود الفيرويد في الجذور، في الورقة المحقونة وفي جميع الأوراق الواقعة فوق الورقة التي حقنت، ولكن ليس في الوريقتين الموجودتين تحت الورقة المحقونة. ومن ناحية أخرى فإن النباتات التي فيها الورقة الأولى فوق الفلقات كانت قد حقنت، أظهرت وجود الفيرويد في جميع الأوراق بالإضافة إلى الجذور. من الدراسات السابقة يمكن القول بأن:-

١ - إن الفيرويد PSTVd عنده المقدرة على أن يتحرك من الورقة المحقونة واصلأ إلى قمة الفرع في النبات ويتضاعف إلى مستويات يمكن اكتشافه في حدود ستة أيام بعد الحقن.

٢ - إن الفيرويد PSTVd يكتشف أولاً في قمة الفرع وفي الأوراق المجاورة للقمة، ثم بعد ذلك في الأوراق الأخرى بين الورقة المحقونة وقمة الفرع وفي الأوراق الملاصقة له وأخيراً في الورقة المحقونة نفسها.

٣ - الفيرويد PSTVd غير قابل للاكتشاف في الأوراق تحت الورقة المحقونة.

هل الفيرويد يسير خلال اللحاء؟؟

نظراً لأن نواجح عملية التمثيل الضوئي تسير في اللحاء وتنتقل من الأوراق الكاملة الإنفراد إلى أعلى حيث تصل الأوراق الحديثة التكشف وإلى قمة الفرع ثم إلى أسفل إلى الجذر، ونظراً لأن هذه الأنسجة هي التي يمكن أن يكتشف فيها

فيرويد PSTVd فى الأوقات المبكرة، فقد أجريت تجربة لتنظيم حركة الفيرويد عن طريق إعادة توجيه سير نواحي عملية التمثيل الضوئى وهذه التجربة كالآتى:-

ظللت ورقة تحت الورقة المحقونة فى وقت الحقن فى ستة نباتات وذلك لتوجيه سير نواحي عملية التمثيل الضوئى فى هذه الورقة. بعد ٢٠ و ٢٣ يوم من الحقن إختيرت أوراق من كل من الثلاثة نباتات وجمعت وإختبرت بإختبار Dot - blot hybridization. وعلى النقيض من نتائج التجارب التى أجريت على الأوراق غير المظلمة، فإن الأوراق المظلمة تحتوى PSTVd ولكن الأوراق التى تحت الأوراق المظلمة لا تحتوى فيرويد. وبالتالي فإن تظليل الأوراق التى تحت الأوراق المحقونة لم يمنع الفيرويد من إختراق إما قمة الفرع أو الأوراق التى فوق تلك الأوراق المحقونة وهذا يؤدى إلى حركة الفيرويد فى الاتجاه السفلى مع نواحي التمثيل الضوئى.

عندما ظللت الأوراق المحقونة لم يكن هناك فيرويد يمكن اكتشاف حركته إلى أسفل، بينما على فترات زمنية من الإختبار فإن حركة الفيرويد فى الأوراق بين القمم والأوراق المحقونة قد تأخر عندما كانت الأوراق المحقونة مظلمة. كذلك فإن تغطية الأوراق المحقونة والتى تؤدى إلى وقف حركة نواحي التمثيل الضوئى فى هذه الأوراق أيضاً أدت إلى تأخير دخول الفيرويد فى الجهاز الوعائى فى النبات بالإضافة إلى تأخير تكاثر الفيرويد فى الأوراق المحقونة. هذا الأخير يمكن أن يعزى إلى المستوى المنخفض فى النشاط التمثيلى فى مثل هذه الأوراق.

مع أن الفيرويد ينتقل إلى أسفل ويصل الجذور بالإضافة إلى إنتقاله إلى أعلى ويصل القمة النامية، فإن تأثير تظليل أوراق مختلفة فى النباتات المحقونة على حركة الفيرويد فى نسيج الجذر لم تختبر، بينما حركة الفيرويد إلى الجذور تكون متعارضة مع قلة الحركة فى الأوراق التى تحت الورقة المحقونة. هذا يتفق مع نظام حركة نواحي التمثيل الضوئى فى اللحاء من الأوراق كاملة الانفراد إلى الأوراق المتكشفة فى الجزء العلوى من النبات وإلى الجذور. عندما عكس اتجاه الحركة فى اللحاء عن طريق منع البناء الضوئى فى ورقة معينة فإن التأثير على حركة كل من الفيروس

والفيرويد يمكن ملاحظتها. هذه النتائج كلها تتفق مع الحركة السريعة الجهازية للفيرويد من الورقة المحقونة إلى النسيج ذو الكفاءة العالية في النمو عبر اللحاء وهذا نفس طريق الفيروسات.

إما عن توزيع السلالتين المعتدلة والشديدة في أجزاء النبات، فإن جدول رقم ٢٨ يبين مدى تجمع الفيرويدات في أجزاء النبات المختلفة، ويوضح الجدول أن تجمع السلالة الشديدة يكون في الأوراق أكبر قليلاً منه في السلالة المعتدلة وكذلك في عيون الدرنات أما في نموات العيون فإن السلالة المعتدلة كانت متجمعة بشكل أكبر.

جدول ٢٨ : اكتشاف السلالة المعتدلة والشديدة في أجزاء النبات المختلفة في سبعة أصناف من البطاطس في طور الإصابة الثاني:

السلالة المعتدلة	السلالة المعتدلة			السلالة الشديدة	السلالة الشديدة			السلالة
	أوراق	درنات	عيون	أوراق	درنات	عيون	أوراق	
-	6/6	+	5/8	-	1/5	+	5/8	Azalia
-	6/6	غير موجود	6/8	-	4/4	+	5/6	Dryf
-	0/6	غير موجود	0/8	-	6/6	+	6/8	Pola
3/8	14/14	+	6/8	12/12	6/7	+	8/8	San
20/20	1/8	+	4/7	27/30	9/9	+	7/7	Sokola
25/25	8/8	+	8/8	10/10	6/6	+	6/8	Tarpan
2/6	4/4	+	5/8	15/15	5/5	+	8/8	Uran

يمثل الكسر عدد النباتات الموجود فيها الفيرويد على عدد النباتات المختبرة
+ تعنى الفيرويد موجود. (-) لم تختبر.

تأثير المسبب على التكاثر الجنسي والانتقال خلال البذور الحقيقية في البطاطس:

لقد تبين أن إصابة نباتات البطاطس بالفيرويد PSTVd يؤثر على التكاثر الجنسي في النباتات. إن الزيادة المطلقة أو النقصان المطلق في هذه العملية يعتمد على

الجينوتايب وعلى وضع الإصابة في الأبوين المستعملين في الزراعة. وبشكل عام فإن أصناف البطاطس المستعملة والمصابة بالفيرويد عند عمل تلقيح بينهما وهما مصابان هذا يؤدي إلى زيادة معنوية في عقد الثمار، زيادة وزن البذور وزيادة في إنبات البذور. عندما يكون الأب (الملقح) مصاب فإن عدد الثمار العاقدة يشابه الكنترول أو أقل وكان هناك زيادة في عدد البذور في كل ثمرة. إن هذه الحقيقة التي ذكرت بزيادة عقد الثمار وإنبات البذور التي تحدث، تفسر بأن هناك ميكانيكية للفيرويد PSTVd في البقاء الدائم في الطبيعة والذي يتناقض مع إصابات الفيروس للنبات حيث أن هذه العمليات تنخفض بشكل واضح في نباتات العائل.

يبدو أن فيرويد الدرنه المغزلية في البطاطس يتكيف بشكل كبير جداً للبقاء الدائم والإنتشار خلال البذور الحقيقية في البطاطس، زيادة على ذلك فإن العلاقة الضعيفة بين ظهور الأعراض على البادرات والمقدرة على الكشف عن الفيرويد جعل اكتشاف البذور الملوثة من الصعوبة بمكان. إن إختيارات البذور الحقيقية في البطاطس أظهرت أن إنتقال الفيرويد خلال البذور يكون نسبة ١٠٠٪ بعد أن تكون هذه البذور قد حفظت على درجة حرارة ٤°م لمدة ١٢ سنة. أما تأثير الفيرويد على عدد البذور فقد وجد أنه إذا كانت الأم سليمة والأب مصاب يكون هناك خفض في عدد البذور بنسبة ٤٦٪ أما إذا كانت الأم مصابة والأب سليم فيحدث زيادة في عدد البذور بنسبة ٦٦٪. أما إذا كانت الأم مصابة والأب مصاب يحدث خفض في عدد البذور بنسبة ٦٢٪.

أما بالنسبة لوزن البذور فإذا كانت الأم سليمة والأب مصاب ينخفض وزن البذور بنسبة ٥٠٪ أما إذا كانت الأم مصابة والأب سليم يزيد وزن البذور بنسبة ٢٦٪. وعندما تكون الأم مصابة والأب مصاب ينخفض وزن البذور بنسبة ٢٥٪.

لقد تم اكتشاف فيرويد PSTVd في حبوب اللقاح في كثير من أصناف البطاطس المزروعة وذلك باستعمال طريقة R - PAGE. إن تلقيح ازهار النباتات السليمة بحبوب لقاح حاملة للفيرويد أدى إلى إصابة الأوراق الموجودة في قاعدة

النورة، الأوراق القمية والدرنات. ويجرى التحليل فى ثمار البطاطس (الثمار الحقيقية) تبين أن هناك إصابات متفرقة فى كل من السلالات، جلد الثمرة ولب الدرنه. أما البذور المأخوذة من كل ثمرة كانت ٣٥ - ٦٦ ٪ مصابة بالفيرويد وإن نسبة الإصابة فى البذور لم تختلف باختلاف الصنف ولم تتأثر بموقع النورة أو بعدد الثمار المتكونة فى نفس النورة.

سلالات الفيرويد:

إن لفيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس سلالتين، إحداهما شديدة Severe والأخرى معتدلة Mild. تختلف السلالة المعتدلة عن السلالة الشديدة فى ثلاثة نيوكليوتيدات متغيرة فقط. توجد السلالة المعتدلة فى الطبيعة عشرة أضعاف وجود السلالة الشديدة. إن تحديد وجود السلالة المعتدلة يتطلب حقن أولى فى نباتات الطماطم بالسلالة المجهولة، يتبع ذلك الحقن بالسلالة الشديدة. إن غياب تكشف الأعراض فى النباتات المحقونة يعتبر دليلاً على وجود السلالة المعتدلة. هذا الإجراء بطى ويحتاج حوالى ٥ - ٧ أسابيع ويتطلب تنمية نباتات الطماطم على درجات حرارة عالية وتوفر سلالة شديدة لاستعمالها فى الحقن.

إن طريقة Polyacrylamide gel electrophoresis استعملت على نطاق واسع لتعريف وتحديد وجود جزيئات الفيرويد فى مستخلص الحمض النووى من النبات، إلا أن طريقة R - PAGE وهى Return polyacrylamide gel electrophoresis استحدثت لوصف الفيروسات والفيرويدات ذات RNA الدائرى. إن هذه الطريقة تستطيع أن تكشف عن فيرويد PSTVd فى عينة تحتوى ٨٠٠ بيكوغرام (البيكوغرام يساوى واحد من مليون مليون غرام) من الفيرويد.

لقد أمكن عزل السلالتين عن بعضهما البعض بطريقة R - PAGE، حيث أن الحمض RNA الفيريوى يهاجر أو ينتقل أكثر بطئاً من الأحماض النووية الأخرى فى المستخلص. إن حركة حزم الفيرويد من العينات المحتوية السلالة الشديدة تكون

٣ - ٤ ملم أبطء في الاتجاه المنعكس Return direction من تلك المحتوية على سلالات معتدلة. إن التحضيرات الممزوجة من السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة المختلفة تنفصل إلى حزمتين محدودتين جيداً والتي توضح الهجرة المختلفة بين السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة. إن الأصل المأخوذ منه المستخلص من الأعضاء المختلفة (درنات، براعم، مدادات وأوراق) أو أنواع النباتات المختلفة (طماطم، بطاطس) *Scopolia sinensis* لا يؤثر على سلوك الهجرة في سلالات الفيرويد. إن هذه الطريقة مؤكدة تماماً مع أكثر من عزلة شديدة وتكون قادرة على عزل وتحديد العزلة المعتدلة من العزلات الشديدة للفيرويد خلال بضع ساعات إذا ما قورنت مع الطرق الأخرى التي تحتاج إلى أسابيع. في هذه الطريقة تعرض جزيئات الفيرويد إلى ظروف دتره وهذا يؤدي إلى الحصول على فصل عن طريق بطء الحركة لجزيئات الفيرويد.

اكتشاف السلالة المعتدلة في بذرة حقيقية واحدة للبطاطس:

إن البذور الحقيقية للبطاطس قد استعملت على نطاق واسع وأصبح عليها طلب كبير في زراعات البطاطس في البلاد النامية وذلك بسبب سهولة إنتقالها وتخزينها وخلوها من الكائنات المرضية التي تصيب البطاطس مع استثناء بعض الفيروسات وفيرويد الدرنة المغزلية في البطاطس. إن البذور الحقيقية للبطاطس قد استعملت في الصين منذ سنة ١٩٧٢.

ينتقل فيرويد الدرنة المغزلية في البطاطس بكفاءة عالية عن طريق البذور في كثير من الموائل النباتية من ضمنها *Solanum tuberosum*. إذا ما تصادف وجود هذا الفيرويد في بذرة حقيقية واحدة للبطاطس أو في إنبوبة اللقاح أو الأجزاء النباتية أثناء عمليات الترية، عندئذ فإن تبادل البذور الحقيقية للبطاطس بين منتجى وزراع البطاطس في الأقطار المختلفة يتطلب سرعة الكشف عن وجود هذا الفيرويد في البذرة. إن بادررات البطاطس الناتجة من زراعة بذور حقيقية للبطاطس والمعروف أنها مصابة ١٠٠٪ بالفيرويد لا يظهر عليها كلها أعراض الإصابة بالفيرويد. في بعض

الحالات فإن هذا الفيريود يمكن أن يكتشف فقط في النباتات ذات عمر ٢ - ٣ أسابيع والنامية من بذور حقيقية مصابة وإذا كانت النباتات ذات عمر أكبر من ذلك فإنه يصعب اكتشاف الفيريود فيها وبالتالي فإن تشخيص الفيريود المبني على الأعراض لوحدها يكون صعب.

إن كشف الفيريود في بذرة حقيقية مفردة للبطاطس كان في السابق يتطلب الحصول على مستخلص الفيريود من البذرة ثم يحقن هذا المستخلص في نباتات طماطم *L. esculentum* يتبع ذلك استعمال طريقة PAGE. إن هذه الطريقة تستعمل عدد محدود من العينات وتحتاج إلى وقت طويل. أما طريقة تهجين الحمض النووي تستطيع أن تكشف الفيريود في بذرة مفردة من بين ١٦ بذرة أو تستطيع أن تكتشف الفيريود من عينة تحتوي بذرة مصابة من بين ٨٠ بذرة سليمة.

أما طريقة R - PAGE فقد أجرى عليها بعض التحويرات للتمييز بين السلالة الشديدة والمعتدلة الموجودة في بذرة حقيقية في البطاطس. ونظراً لأن كمية البذور المتحصل عليها من الحقول المزروعة بالبطاطس والمصابة بالفيريود تختلف في نسبة الإصابة فقد أمكن اكتشاف الفيريود في بذرة مفردة ساكنة أو بذرة مفردة قد نمت. وتبين أن البذرة المفردة الساكنة تحتوي ٠,٨ - ١٠ نانوغرام من RNA الفيريودي في البذرة الواحدة. وقد أمكن بطريقة R - PAGE اكتشاف الفيريود في مستخلص بذرة مفردة مخفف ١ : ١٦ يعني حوالي ٥٠٠ بيكوغرام.

إن البذور المنبئة والبذور الحقيقية للبطاطس النامية في المعمل على درجة ١٩°م أظهرت معدلات متشابهة في نقل الفيريود عن طريق البذور. لم يكن هناك تغير في اكتشاف الفيريود في البادرات النامية من بذرة حقيقية مفردة نامية لمدة ٤ - ١٠ أسابيع. في العينات المختلطة من بذور حقيقية سليمة وأخرى مصابة بالفيريود فقد أمكن اكتشاف الفيريود في بذرة واحدة من بين ٩٠ - ١٠٠ بذرة سليمة. إن استعمال طريقة R - PAGE هي طريقة الشبه في النتائج المتحصل عليها من طريقة تهجين الحمض النووي.

المدى العائلي :

إن أمراض النبات المتسببة عن فيروسات من الممكن أن تقاوم عن طريق ادخال أصناف مقاومة للمرض، هذه الفكرة أدت إلى إجراء أبحاث كثيرة عن مدى قابلية أو مقاومة الأصناف المختلفة من البطاطس للإصابة بالمرض. لقد أجريت اختبارات على ٨١ نوع من البطاطس لمعرفة تفاعلها مع الفيروس. فوجد أن خمسة أنواع المذكورة فيما يلي هي مقاومة للمرض :-

1 - *Solanum guerreroense*

2 - *S. hjertingii*

3 - *S. multidissectum*

4 - *S. acaule* بعض الطرز فقط

5 - *S. berthaultii*

كذلك فإنه لم يوجد أى صنف منيع Immune ضد الإصابة بفيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس وباستثناء الأنواع المذكورة فإن جميع الأصناف تظهر أعراض الإصابة بالمرض. هناك ٣٨ نوع من البطاطس تصاب بالفيروس ولكنها تكون Symptomless. كذلك يوجد بعض الطرز تكون مقاومة للفيروس عندما يجرى لها حقن بواسطة العصارة ولكنها تصبح قابلة للإصابة إذا حقنت بالتطعيم. لا يوجد أى صنف تابع للنوع *Solanum tuberosum* ذو مقاومة عالية للمرض. يصيب الفيروس معظم أنواع العائلة الباذنجانية، أما العائل المخصص له فهو نبات الطماطم *Lycopersicon esculantum* Rutgers.

تشخيص الفيروس :

عند أخذ أجزاء النبات المصابة بفيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس PSTVd وكذلك أنسجة الدرنه المصابة وتعريضها مرات متكررة للتجميد والإذابة تحت

ظروف متحكم بها (١٨°م إلى - ٢٠°م) ثم ٥°م فإن الفيرويد يفقد من هذه الأنسجة ووجد أنه يخفى بسرعة أكثر في نسيج الدرنه منه في العروش. إن درنات ١٧ صنف بطاطس أظهرت نفس النتيجة ولكن بشئ من الاختلاف. في ٧ أصناف من بين ١٧ صنف فإن الفيرويد إنخفض وجوده بشكل معنوى بعد المعاملة بالتجميد والإذابة مرة واحدة. في ٦ أصناف من بين ١٧ صنف فإن الفيرويد يمكن أن يسترجع حيويته وبسبب أمراض ثانية بالرغم من تعرضه للتجميد والإذابة. أما عند تعريض درنات البطاطس المصابة بالفيرويد إلى درجة حرارة من ١٣,١°م إلى - ١٥,١°م هذا يؤدي إلى التخلص التام من الفيرويد في الدرنات.

إن فيروس PSTVd مقاوم لدرجات الحرارة المرتفعة والمنخفضة وتغيرات pH البيئة. درجة الحرارة المثبطة للفيرويد في العصارة تقع ما بين ٧٥ - ٨٠°م أما في تخضيرات الفيرويد تكون ٩٩ - ١٠٠°م. درجة التخفيف القصوى ٥ × ١٠ - ٤ ملخ / ملتر. إن حيوية العصارة في نباتات الطماطم المصابة بالفيرويد يمكن أن يحتفظ بها لمدة أربعة أيام على درجة ٢٠°م و ١٠ أيام على درجة حرارة ٤°م. أما عصارة نباتات البطاطس تدوم لمدة ٣، ١٠ أيام بالترتيب بالنسبة للطماطم. أما الفيرويد نفسه RNA فيبقى محفوظ بحيويته لمدة ٤٠ - ٤٥ يوم على ٢٠°م ولمدة ٥٠ - ٦٠ يوم على ٤°م. عند تخزين الأجزاء النباتية المصابة بالفيرويد وكذلك تخضيرات RNA لمدة طويلة على (- ٢٠°م) فلا يبقى الفيرويد حياً في النبات.

وجد أن أفضل تركيز للفيرويد في نباتات الطماطم يكون عند نموها على درجة حرارة ٣١°م ويكون التركيز أقل عند نموها على درجة حرارة ٢٣°م وعلى شدة إضاءة مختلفة. إن تقصير فترة الإضاءة لمدة ١٧ - ١٨ ساعة يومياً لا تؤثر على بناء الفيرويدات في النبات، أما على ٣١°م فإن الأعراض التي تكون شديدة إذا تعرضت لإضاءة منخفضة تنخفض شدة الأعراض هذه وتتأخر في الظهور ثانية. أما على درجة ٢٣°م فإن الأعراض تتأخر أسبوعين إذا كانت الإضاءة منخفضة أو مرتفعة. لا تظهر الأعراض إذا وصلت درجة الحرارة ١٥°م في الليل. إن الأعراض التي تكون

على شكل نكروز في الأوراق تظهر بشكل واضح في درجات الحرارة المتوسطة أكثر منه عندما تكون درجات الحرارة عالية هذا يشابه الإصابة الفيروسية.

يمكن تثبيط الإصابة بالفيروس PSTVd عن طريق استعمال-DNA Oligonucleotide. لقد أمكن إجراء تهجين بين مجموعة نيوكليوتيدات قصيرة وفيروس PSTVd في مخلوط معدي. عندئذ تثبط إصابة الفيروس بنسبة ٧٥٪. عندما تكون مجموعة النيوكليوتيدات القصيرة مكاملة للنيوكليوتيدات ٧٩ - ١١٠ من الفيروس. وإن التثبيط الكلي للإصابة الفيروسية لوحظت عند استعمال مجموعة نيوكليوتيدات قصيرة مكاملة للنيوكليوتيدات ٤٢ - ٢٨ في نفس المولر زيادة من DNA فوق PSTVd، مع أن ٢٠٠ ضعف مولر زيادة كانت كافية للتثبيط الكامل للإصابة بالفيروس PSTVd.

إن مجموعة النيوكليوتيدات القصيرة هذه تخفض الإصابة بالفيروسات بنسبة ٨٣٪ عندما يتم التهجين على درجة حرارة ٣٠م. أما مجموعة النيوكليوتيدات القصيرة المحتوية ٢٢ و ١٥ قاعدة متوافقة مع مراكز ٤٢ - ٦٢ و ٦٣ - ٧٨ تظهر تأثير معنوي في خفض الإصابة على درجات الحرارة المرتفعة جداً.

كما وأن DNA مضاد المعنى المكمل للنطاق الخاص بالمرضية (نيوكليوتيدات ٤٢ - ٧٨) في الخيط العلوي من الفيروس PSTVd يثبط حيوية الفيروس عندما يحصل لها تهجين في المعمل لعمل معقد DNA / RNA هذا التثبيط لوحظ في النباتات السليمة وفي بروتوبلاست النبات.

٢ - فيروسات الحمضيات

Citrus Viroids

١ - وصف وتصنيف (تقسيم) فيروسات الحمضيات

مقدمة :

إن أهمية حدوث الأمراض الفيرويدية فى الحمضيات قد تم تحديدها منذ تعريف فيروس إكسوكورتز الحمضيات كنوع ممثل لهذه المجموعة التى هى عبارة عن حمض نووى RNA ممرض. وحتى سنة ١٩٨٥ بقى فيروس إكسوكورتز الحمضيات CEVd هو الفيرويد الوحيد المعروف جيداً والمعروف أنه يؤثر على الحمضيات. كذلك فإن أبحاثاً كثيرة قد ذكرت بأن هناك مرض يصيب الحمضيات اسمه مرض ككسيا Cachexia وذلك سنة ١٩٨٣، إلا أن هذا المرض كان معروفاً منذ سنة ١٩٢٥ واعتبر أنه مرض فيروسى ثم أثبتت الأبحاث بعد ذلك بأنه مرض فيرويدى. وكان يسمى فى السابق مرض زايلوبوروسز Xyloporosis وينتشر فى منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط.

ظهرت بعد ذلك تقارير حديثة تفيد بأن هناك فيروس مميز عن كلا الفيرويدين السابقين ولكنه يحدث أعراض مرض إكسوكورتز متوسطة إلى شديدة على الارجح أو المسترون *Citrus medica* وبالتالي سمي Citron Variable viroid ويرمز له (CVAvd) وذلك منذ سنة ١٩٨٥. ثم بعد ذلك تم تعريف أعداداً أخرى من الفيرويدات التى تصيب الحمضيات، بعضها وصف على أنه سلالة بسيطة من CEVd والبعض الآخر حدد على أنه فيروس منفصل.

بعد الدراسات المستمرة على فيروسات الحمضيات ثبت بأنها مجموعة كبيرة من الفيروسات أكثر منها في أى مجموعة نباتية أخرى. ولقد قدر عدد هذه الفيروسات حوالي ١٢ فيروس وهو مقسم إلى خمسة مجموعات وذلك اعتماداً على حجم الجزيء، تماثل تتابع النيوكليوتيدات وتفاعل العائل. إن التقدم في تعريف هذا العدد الكبير من فيروسات الحمضيات قد تم نتيجة معرفة عائل مشخص جديد وهو الاترج *Citron medica* حيث أن هذا العائل عنده المقدرة بأن يكون عائل عام لجميع فيروسات الحمضيات. إن البادرات الحساسة لطراز من السترون (الاترج) وهو نوع SI - 861 Arizona قد عمل كحاوية أولية لفهرسة مرض الاكسوكورتز وذلك لمدة عشرة سنوات منذ سنة ١٩٧٧. هذا الطراز من الاترج يكون أيضاً عائل بدون أعراض Symptomless لفيروس ككسيا في الحمضيات.

إن الأبحاث القديمة التي كانت تجرى على مرض اكسوكورتز الحمضيات كانت تذكر أعراض المرض بأنها تشوهات في قلف الشجرة وانفصاله عن الساق وتشققه، هذه الأعراض تظهر على الأصل، ويظهر تقزم ملحوظ في الأشجار النامية على برتقال ثلاثي الأوراق *Poncirus trifoliata* وأصول ليمون *Citrus limo-* (Rangpru) *nia*. وهكذا فإن الاختلافات في درجة التقزم وتكون القشور ووقت ظهور هذه الأعراض التي كانت تذكرها الأبحاث القديمة أدت إلى القول بأن هناك سلالات مختلفة من مسبب مرض اكسوكورتز الحمضيات.

إن تطور ظهور الاختبارات الحيوية باستعمال الاترج *Citrus medica* وحساسيته العالية وسرعة تكشف الأعراض عليه أدى إلى التنازل الفعلي عن البرتقال ثلاثي الأوراق ذو النظام الكلاسيكي في فهرسة المرض كما وأن ظهور تنوعات من الأعراض على الاترج تتراوح من تقزم شديد تدلى الأوراق وتجمعدها ونكروز والتفاف عنق الورقة بالإضافة إلى نكروز العرق الوسطى والتلون البني لقمة نصل الورقة، كلها اعتبرت أدلة مشخصة للإصابة بمرض اكسوكورتز الحمضيات.

الأعراض الحقلية كانت دائماً تصنف على أساس أعراض بسيطة، متوسطة أو شديدة فقط وذلك على أساس تفاعل الاترج. فى معظم الحالات فإن هذا التصنيف لم يتأكد عن طريق حقن البرتقال ثلاثى الأوراق لتثبيت الأعراض الكلاسيكية لمرض اكسوكورتز الحمضيات.

بعد نقل العزلات الشديدة لسبب المرض إلى عوائل عشبية مثل *Gynura auran- tiaca* فإن العامل المسبب أمكن عزله ووصفه بأنه يتكون من حمض نووى RNA به ٣٧١ نيوكليتيده وسمى فيروسد اكسوكورتز الحمضيات- The citrus exo- cortis viroid. عند حقن الاترج بتحضيرات نقية من فيروسد CEVd المأخوذ من نبات *Gynura* دائماً يظهر عليه أعراض التقزم الشديدة، تدلى الأوراق وتجدها، هذه الأعراض توصف بها العزلات الشديدة. أما مصادر العدوى التى تسبب تفاعل بسيط أو معتدل مع الاترج لا يمكن أن تنقل إلى نبات *Gynura*.

واعتماداً على نتيجة الأبحاث التى أجراها Schlemmer et al سنة ١٩٨٥ والعالم Duran - Vila et al سنة ١٩٨٦ فإنهم قد ضموا على الأقل ثلاثة فيروسيدات مميزة تسبب أعراض بسيطة ومتوسطة على الاترج، إلا أنهم قد ذكروا بأن تحليل الأعراض الحقلية كلها بواسطة تتابع طريقة PAGE قد أظهرت بأنها تحتوى من واحد إلى خمسة فيروسيدات.

أما باستعمال طرق الكشف الأكثر تقدماً فى أبحاث الفيروسيدات وباستعمال طرق تحليل الكروماتوغرافى السليوليوزية CF- 11 والتهجين الجزيئى لمنقب خاص بفيروسد الحمضيات أمكن وصف عدداً من فيروسيدات الحمضيات من مصادر حقلية ومن مجموعات فيروسدية أخرى فى أسبانيا وكاليفورنيا وكانت هذه الفيروسيدات الموصوفة تحدد اعتماداً على الصفات الفيزيائية والحيوية وقد ذكرت بأنها خمسة مجموعات محددة.

تطابق فيروسات الحمضيات في عزلات الاكسوكورتز:

Identification of Citrus Viroids In Exocortis Isolates

إن نتائج الأبحاث التي قام بها Duran - Vila سنة ١٩٨٦ تدل على أن العوامل القابلة للانتقال المرافقة مع مرض اكسوكورتز الحمضيات يمكن أن تضم عائلة من الفيروسات عدا عن CEVd وأن هجوم هذه الفيروسات تتراوح من ٢٧٥ - ٣٧١ نيوكليتيده. عندما حضر خليط صناعي من تحضيرات حمض نووي من أترج (سترون) بعزلات منتقاه ثم عرضت للتحليل بطريقة تنابع PAGE، ظهر أن هناك ثمانية فيروسات على الأقل عدا عن فيروس CEVd وفيروس الأترج المتقلب (Citron Variable Viroid (CVaVd. ولكي تختبر صفات هذه الفيروسات، تؤخذ مزارع نقية من هذه العزلات حيث توجد طبيعياً ويمكن أن تتناسخ في عوائل عشبية خاصة أو عن طريق electron - elution لشريحة فيروس مفردة بعد عملية PAGE d. هذه الأحماض النووية للفيروسات وصفت وحددت باستعمال الطرق الآتية:-

- ١ - يمكن اكتشاف الأشكال الدائرية والمستقيمة بواسطة طريقة PAGE d.
 - ٢ - مقارنة معدلات الهجرة للأشكال الدائرية.
 - ٣ - تحديد إيجذابها في طريقة CF-11 سليليوز.
 - ٤ - تقدير تماثل تنابع نيوكليتيدها باستعمال التهجين الجزيئي عن طريق المنقب cDNA للفيروسات الخاصة.
- بعد إجراء هذه الطرق على الفيروسات تبين أنها تتكون من خمسة مجموعات. المجموعة الأولى هي مجموعة CEVd أما المجموعة الثانية فهي مجموعة فيروسات الحمضيات رقم I وتسمى I - CVd وهذه المجموعة تشمل فيروسين الأول 1a والثاني 1b. أما المجموعة الثالثة فهي مجموعة فيروسات الحمضيات رقم II

وتسمى II - CVd وهي تشمل أيضاً II a ، II b وإن هذا الأخير كان يسمى فيرويد ككسيا للحمضيات Citrus Cachexia Viroid ويرمز له (CCaVd). أما المجموعة الرابعة فهي تشمل أربعة فيرويدات IIIa - CVd ، IIIb ، IIIc ، IIId. أما المجموعة الخامسة فهي تسمى مجموعة الحمضيات رقم IV وتضم فيرويد واحد فقط. وبالتالي يكون هناك عشرة فيرويدات تصيب الحمضيات كما هو ظاهر في جدول رقم ٢٩.

جدول ٢٩: مقارنة بين الصفات الفيزيائية لفرويدات الحمضيات.

تفاعل التجهين مع مثلب cDNA				النسبة المئوية للإنتونل التي فيها تبدأ الفرويدات في التفتت		الفرويد		
ASBVd	CCaVd	CVd - Ib	CEVd	٪٢٠	٪٢٥	عدد النوكليوتيدات	الفرويد	المجموعة
—	—	-/+	+++	+	—	٣٧١	CEVd	CEVd
—	—	+++	—	+	—	٣٤٠	CVd - Ia	CVd - I
—	—	+++	—	+	—	٣١٨ ، ٣٢٠	CVd - Ib	
—	+++	—	—	—	+	٣٠٢ ، ٣٠٥	CVd - IIa	CVd - II
—	+++	—	—	—	+	٢٩٩ ، ٣٠٠	CVd - Ib	
—	—	—	—	—	+	—	CVd - IIIa	CVd - III
—	—	—	—	+	—	٢٩٠	CVd - IIIb	
—	—	—	—	+	—	٢٨٥	CVd - IIIc	
—	—	—	—	+	—	٢٨٠	CVd - IIId	
—	—	—	+	—	+	٢٧٥	CVd - IV	CVd - IV

ملاحظات على الجدول: -

- ١ - الفرويد الذي لماده رنمين عن عدد النوكليوتيدات يدل الرقم الأول على الأبحاث القديمة والرقم الثاني مأخوذ من الأبحاث الحديثة.
- ٢ - يتم تحديد القواعد اعتماداً على حركة الفرويدات في ال PAGE.
- ٣ - التفاعل النسي مع cDNA - حد بواسطة Electrophoretic hybridization. تبدأ بعمل (+) إلى أعلى مستوى (++++). حتى على التفتت المنظر (كذلك للترشح Autoradiograph عدد مغلفتها مع تركيز الفرويد، كما يلاحظ بعد الصبغ بمادة يورانيك الإيثيديوم قبل ال electrophoresis).

تعريف مجموعات فيروسات الحمضيات :

Definition of Citrus Viroid Groups

١ - مجموعة CEVd :

هذه المجموعة تمثل مجموع الفيروسات (العزلات، التنوعات، الأشكال) التي تتبع فيروس أكسوكورنات الحمضيات. إن فيروس أكسوكورنات الحمضيات CEVd هو العامل المسبب لمرض أكسوكورنات الحمضيات وهو أكبر فيروسات الحمضيات إنتشاراً وأكثرها دراسة وتحديداً وله تنوعات تتبع ذات نيوكليتيديات تتراوح من ٣٧١ إلى ٣٧٥. وهو أكثر فيروسات الحمضيات سهولة ودراسة وله مدى عوالمى واسع أكبر من بقية فيروسات الحمضيات كما هو فى جدول ٣٠ وهو يسبب تقزم شديد، تدلى الأوراق ونكرووز على أشجار الاترج المحقونة به وسوف نتكلم عن المرض بالتفصيل فيما بعد إن شاء الله.

حالة شاذة لفيروس CEVd :

هناك تنوع غير عادى لفيروس أكسوكورنات الحمضيات اكتشف سنة ١٩٩٣ من قبل العالم J.S. Semancik ورقائه وذلك أثناء عملهم على *G. aurantiaca*. وجد هذا الفيروس عندما استعمل مصدر لقاح من *G. aurantiaca* واستعمل لحقن هجين طماطم نانج من تلقى الطماطم *Lycopersicon esculentum X L. peruvia*. وجد أن هذا التنوع يحوى ٩٢ نيوكليتيديداً إضافية على النيوكليتيديات الأصلية فى CEVd. وحيث أن الوضع الطبيعى لفيروس CEVd يحوى ٣٧١ نيوكليتيديداً فيصبح التنوع الجديد به ٤٦٣ نيوكليتيديداً وسمى هذا النوع- CEVd D92 والذي يظهر صفات الشكل المستقيم والدائرى للفيروس ويحوى تنوع مكرر مرتين للمسافة بين نطاق V و T₂ وهذا التكرار يساوى ٩٢ نيوكليتيديداً. هذا الفيروس يعطى أعراض بسيطة جداً أقل من الأعراض المعتدلة تظهر على *Gynura*. عند مقارنة هذا الفيروس (مقارنة تنوع وتركيب D92 - CEVd) مع فيروس

كادانج - كادانج ظهرت تشابهات في المناطق المولدة للتكرار الطرفي الذى يحدث طبيعياً، مما يودى إلى الاقتراح إلى إمكانية تحديد الموقع المفضل لإعادة الاتحاد فى RNA بين الفيروسات.

إن الطريقة الصحيحة لتولد D92 - CEVd غير معروفة، وعلى أية حال فإن اللقاح الأصلي هو CEVd تنوع t ويكتب (CEVd t) إختبر بواسطة هجين طماطم. إنه من غير الممكن تقليد أو الحث على إنتاج هذه المجموعة ٩٢ الزيادة فى تنوع CEVd. هناك عاملان يبدو أنهما أساسيان فى تخليق وإحداث D92 - CEVd هما: ١ - هجين الطماطم الناتج من تلقيح *L. esculentum* مع *L. peruvianum*. ٢ - وجود عزلة CEVd مختارة بواسطة ذلك العائل من بين تجمعات CEVd المنتجة فى نبات *Gynura*. إن الطماطم الهجين ليست هى النقطة الأساسية فقط فى إشتقاق D92 - CEVd ولكنها تلائم تكاثر وتجمع تنوع ال ٤٦٣ نيوكليتيده أكثر منه فى آل CEVd.

إن السلالة D92 - CEVd لم تعرف أبداً منذ ما يزيد عن ٢٠ سنة من الأبحاث المستمرة على فيروس CEVd فى الجينورا، زيادة على ذلك لم يكن هناك دليل على تناسخ هذه السلالة عندما كان يخلط CEVd و D92 - CEVd كمصدر لقاح فى الجينورا. مع ذلك فإنه من الممكن القول بالنقل المنفصل لهذه السلالة فى الجينورا عندما يستعمل اللقاح الأولي كمصدر نقى من هذه السلالة. هذا يمكن أن يدل على أن تخليق الزيادة الطرفية فى CEVd لا يكون محدوداً أو أنه حادث غير عادى ولكن إلى حد ما فإن هذا التناسخ والتجمع لهذا التنوع يكون معرضاً إلى منافسة غير ملاحظة مع CEVd فى بعض العوائل.

فى عملية إصابة الجينورا بالسلالة D92 - CEVd يظهر تغيرات مرضية بسيطة جداً وتكون على شكل نكروز يتقاطع مع العرق الوسطى فى الورقة، وهذا يمثل أبسط أنواع التفاعل المذكورة لأى عزلة من الفيروس CEVd فى الجينورا. إن وجود نفس تتابع النيوكليتيدهات كما فى CEVd والذى يحدث تفاعل شديد من

الأعراض مع زيادة في العدد الكلى للنيوكلييتيدات يؤكد مرة ثانية أهمية التكوين في تعبيرات النشاط الحيوى فى الفيروسات. ولكن يبقى السؤال المثير وهو لماذا تحدث أعراض بسيطة من هذه العزلة؟؟.

إن تتابع النيوكلييتيدات فى السلالة C - CEVd تختلف عن السلالة A - CEVd فى أربعة قواعد فقط هى رقم ٢٦٤، ٢٧٨، ٣٠١، ٣١٣. لقد استعملت السلالة C كمرجع لدراسة تتابع العزلة الجديدة D92 - CEVd وذلك نظراً لأن كلا العزلتين مأخوذة من نفس أصل المصدر وتكاثرت فى الجينورا *Gynura*. كما وأن تتابع السلالة الجديدة تشارك سلالة A على مواقع تركيبيّة متساوية فى ثلاثة نيوكلييتيدات هى أرقام ٢٦٤، ٢٧٨، ٣٠١ وهى من الأربعة مواقع المميزة للسلالة A عن السلالة C. وبالتالي فإن الاختلافات بين عزلات الفيروس CEVd تكون أقل حد ممكن.

يجب أن نعطي أهمية لحقيقة أن كلا التتابعين فى سلالة A وسلالة C قد حدد من قبل عشرة سنوات (١٩٨٣) وذلك عن طريق التتابع المباشر للحمض RNA وأن هذه الطريقة وهذا الوقت قد يكون له بعض الأخطاء. وعلى أية حال فإن تتابعات ثلاثة أرباع الطول الكامل لكلونات العزلة الجديدة كانت مثالية وبالتالي تدل على درجة عالية من التماثل فى تجمعات العزلة الجديدة مقوية العلاقة القريبة مع التتابعات المذكورة للسلالة A مع تلك التى فى السلالة C.

بمعاينة المناطق ذات التتابع المتكرر فى العزلة D92 - CEVd يلاحظ أن أربعة نيوكلييتيدات متسلسلة هى AGCU تسبق مباشرة بداية ونهاية التكرار العلوى على نهايات ١٣٢ إلى ١٣٥ و ١٧٩ إلى ١٨٢ بالترتيب، هذه المواقع تدعم النموذج المتوقع حين حدوث تأثيرات فجائية لـ RNA Polymerase فى عمل نسخ متقطع، كما قد اقترح عند حدوث التكرار الطرفى الموجود فى فيروس CCCVd. إن أهمية هذه النيوكلييتيدات الأربعة فى العروة النهائية من نطاق T₂ قد ظهرت عند فقد الحيوية للفيروس بعد إزالتها من التتابع، وبالتالي فإن التعبيرات البيولوجية

لفيروس CEVd يمكن أن تستبدل بشدة بواسطة إما غياب أو تكرار هذه الأربعة قواعد وهذا يبنى إقتراحاً عن أهمية القواعد في تجهيز الحمض RNA.

إن التابع المتكرر في CEVd - D92 يبدأ تقريباً على حد اليد اليمنى بالضبط من منطقة Pr ضمن نطاق V وهو موقع هام يتدخل في إعادة تنظيم RNA بين الفيروسات، وبالتالي فإن المرضية يمكن أن تتغير بشكل مثير في غياب التتابعات الأساسية في نطاق P أو التغير العال في منطقة Pr من نطاق V.

إن تحريك أو تميعة نطاق T تفهم ضمناً من دراسة تماثل تتابع الفيروس وصفات الفيروس المتوقع. إن إلتجاه تكرار T_2 في فيروس CCCVd وكذلك كما حدث في CEVd من تضاعف يمكن أن يهدف إلى مواقع التجهيز المشجع في تغييرات RNA في نطاقات T بين الفيروسات وبالتالي يمكن أن تكون مهمة في إعادة الاتحاد والتطور في جزئ الفيروس.

قياساً على ظهور السلالة الجديدة D92 لفيروس اكسوكورتز الحمضيات فإن التابع المتكرر المشابه في نطاقات V و T_2 في الفيروس CCCVd يجب أن لا ينظر إليه الآن وكأنه ظاهرة غريبة. إن التطابق الموجود بين التركيبين يؤدي إلى القول بأن حوادث مماثلة في تجهيز الفيروس يمكن أن تحدث في المستقبل في التنوعات الكبيرة. كذلك فإنه عند مقارنة CCCVd والسلالة الجديدة CEVd - D92 يظهر أن هناك مواقع خاصة ظاهرة ذات أهمية والتي يمكن أن تكون هامة جداً في تجهيز RNA أو تمكس بسهولة أية مناطق يمكن أن يظهر فيها ارتباط في التركيب.

٢ - مجموعة 1 - CVd :

وجد أنه بعد تحليل عزلات الاكسوكورتز في كل من إسبانيا وكاليفورنيا تبين وجود فيروس CVd - 1a بنفس electrophoretic mobility (كما في

الفيروس RNA - 1 الذى ذكر فى أبحاث سابقة وأنه مسبب مرض للحمضيات فى سبعة عزلات من بين ٣٧ عزلة مختبرة. عندما عرضت العزلات المختارة إلى Co electrophoresis - كمخلوط صناعي تحت ظروف دنتره، لم يلاحظ اختلافات فى معدل الهجرة فى عزلة Cvd - 1a للمأخوذة من مصادر مختلفة. وعلى التقيض من التفاعل الشديد المحدث بواسطة CEVd فى الأترج (السترون) وحيث أن أشجار السترون المحقونة بالفيروس Cvd - 1a نقي قد أظهرت التواء ملحوظ فى نصل الورقة وذلك كاستجابة للمواقع التى فيها تكثرت فى العرق الوسطى للورقة على السطح السفلى، على ١ - ٣ ورقات فقط من النباتات المحقونة.

إن التركيب الأساسى لمكونات عزلة فيروس CvaVd (فيروس السترون المتقلب وهو Citron Variable Viroid) عند إجراء تحليل لها وجد أنها تهاجر بسرعة أكثر قليلاً من Cvd - 1a وبالتالي عرفت على أنها Cvd - 1b. هذه العلاقة المفهومة ضمناً مبنية على الحجم الذى حصل عليه بالاعتماد على معدلات متشابهة من الإزالة لـ Cvd - 1a و Cvd - 1b من سيليلوز CG 11 وإن كلا الفيروسين له مدى عائلي مقتصر على الأترج (السترون) كما فى جدول ٣٠.

إن تماثل تتابع النيوكليوتيدات بين Cvd - 1a و Cvd - 1b يقدر بواسطة التهجين الجزيئى بمنقب Cvd - 1b cDNA. عند مقارنة عينات من الحمض النووى مأخوذ من الأترج المحقون بعزلتين من Cvd - 1a وعينة نقية من Cvd - 1b (استعملت العزلة CvaVd لتفقية Cvd - 1b) أجرى لهما electrotransferred مباشرة من الجيل محتوي ٨ مول يوريا وهجنت مع Randomly Primed P³² la- belled Cvd - 1b cDNA فبين أن العزلتين هما فيروسين منفصلين Cvd - 1a و Cvd - 1b.

جدول ٣٠: إنتقال وكثافة الأعراض لفيرويدات الحمضيات في كواشف خاصة بالفيرويد.

الأعراض في النباتات الكاشفة				المجموعة الفيرويد	
الانترج	الغيار	الاقحوان	جانبورا		
++++	+	++++	++++	CEVd	CEVd
++	-	-	-	CVd - Ia	CVd - I
++	-	-	-	CVd - Ib	
+	+++	++	-	CVd - IIa	CVd - II
+	+++	++	-	CVd - IIb	
+++	-	-	-	CVd - IIIa	CVd - III
+++	-	-	-	CVd - IIIb	
+++	-	-	-	CVd - IIIc	
+++	-	-	-	CVd - IIId	
+++	+	-	-	CVd - IV	CVd - IV

ملاحظات:

++++ = شديد، +++ = متوسط، ++ = بسيط، + = حامل بدون أعراض

- = بدون أعراض ولكن لا يتكاثر الفيرويد في النبات.

في دراسة أجراها Lilach Ashulin وزملائه في مركز أبحاث بيت دجن في إسرائيل سنة ١٩٩١ ذكر فيها أن الفيرويد CVd - 1b هو فيرويد منفصل عن مجموعة فيرويدات الحمضيات. ولقد وجدوا أن هذا الفيرويد يسبب تقزم أشجار الكريب فروت Grapefruit في إسرائيل ويسبب إنحاء أوراق الحمضيات وسمى Citrus bent leaf Viroid ويرمز له (CBLVd) ولقد عزل ونقى من أوراق

الأفوكادو وبعد إنباع جميع طرق العزل والتتابع لهذا الفيرويد وجد أنه يتكون من ٣١٨ نيوكليوتيدة (كان قد ذكر سابقاً أنه يتكون من ٣٣٠ نيوكليوتيدة) وقد ذكروا أن هذه النيوكليوتيدات فى خط مستقيم كما فى شكل ٤٠ ووجد أن به ٧٦٦ أزواج قواعد وقد صنفوا هذا الفيرويد مع تحت مجموعة ASSVd وذلك اعتماداً على مميزات المنطقة المركزية المحفوظة. فى حين أن جزء من منطقة النطاق P ومنطقة النهاية اليسرى تشبه فيرويد CEVd، وبالتالي ذكروا أن هذا الفيرويد هو أول فيرويد من تحت مجموعة ASSVd يصيب نباتات الحمضيات.

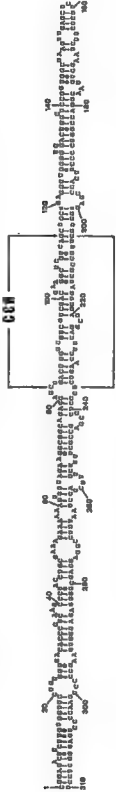
نقل فيرويد Cvd - 1b إلى الأفوكادو:

لقد تم نقل الفيرويد Cvd - 1b إلى الأفوكادو بواسطة التطعيم غير المتوافق، حيث نقل هذا الفيرويد من *Citrus macrophylla* بالتطعيم إلى بادرات الأفوكادو *Persea americana*. ولقد وجد أن النقل المستمر لهذا الفيرويد بالتطعيم غير المتوافق له مدى عائلى محدود فى بضعة طرز من الأفوكادو. إن المستخلص المأخوذ من أفوكادو مصاب بالفيرويد Cvd - 1b كان فعال على السترون (الأنرج) وأحداث إلتواء فى الأوراق وتشوه الثمرة. كان أول تقرير عن إنتقال هذا الفيرويد إلى عائلى غير الحمضيات بواسطة Rivka et al سنة ١٩٩٢ فى إسرائيل. إن مستخلصات الحمض النووى والنسيج المطعوم من أفوكادو نوع WI المصاب بالفيرويد Cvd - 1b كانت فعالة على الأنرج. إن هذا الفيرويد أمكن اكتشافه فقط بواسطة طريقة تحليل sPAGE فى نباتات الأنرج والتي حقنت ميكانيكياً أو طعمت بنسيج مأخوذ من أفوكادو مصاب بالفيرويد Cvd - 1b. هذا يؤدى إلى القول بأن نباتات الأفوكادو لم تصبح شاذة أو أقل من أن تصاب بالفيرويدات الأخرى (عدا عن الفيرويد الخاص بها) الموجودة فى *C. macrophylla*. إن نباتات الأفوكادو المحقونة بعزلة تسمى S - 225 GTD (عزلة تحمل عوامل التقزم القابلة للانتقال بالتطعيم) وهى تابعة للفيرويد Cvd - 1b فوجد أن تركيز الفيرويد فى أوراق الأفوكادو خمسة إلى عشرة أضعافه فى الأنرج، هذا يجعل الأفوكادو مصدر جيد لدراسة الصفات الأخرى لهذا الفيرويد. ولقد وجد أن تشوه ثمار الأنرج يمكن أيضاً أن يفسر كنتيجة للإصابة بهذا الفيرويد Cvd - 1b.

شكل رقم ٤٠ :

سلسل تاليع النيوكليوتيدات في الفيريد CVD-1b وكللك تريب النيوكليوتيدات من ٣١٨

1 CGGAGACUUC UUGUGGUUCC UGUGGUGACA CGGCUCAAGC CGUAGCUGCS 50
51 AAAGAAAAA GUGUAGAAG GCGGACAGAG AGCUGACUUG UCUCUCUGCA 100
101 CGAAGGCUUG UCAGCUGCGG AGGUGUGGGU CGACUGGCGUC CGGUGGCGAA 150
151 GUGAGCUCU GCUUCUCUAA GCUGUAAAGG ACCGUUGCGC UUGACGCGAG 200
201 CGGUGCUUG CGCUAGUGCA GCGGACUUCG AAGUCUCCU CGGAGCGCG 250
251 UUUUCUUUG UACCUAAUUU CCGUAGCAGG GGGGAGAGGG UGAAGGCCCU 300
301 GAAGCCGUGA GGGCUCU 318



إن التطعيم غير المتوافق بين عوائل غير متوافقة قد ذكر سابقاً بأنه يستعمل لنقل الفيرويدات لنباتات كاشفة. واعتماداً على ذلك يمكن أن تمتد عوائل الفيرويد إلى محاصيل نباتية مهمة إقتصادياً، ويمكن أن تزداد أهميته الاقتصادية ونحصل على فوائد علمية من حيث استعمال إختبارات النقل بالتطعيم غير المتوافق للبحث عن المدى العائلي للفيرويدات المعروفة على الأشجار المثمرة والمهمة إقتصادياً.

٣ - مجموعة CVD-II :

كما ذكرنا سابقاً فإن العالم *Duran - Vila et al* سنة ١٩٨٦ قد ذكروا بأن هناك مجموعة فيرويدية سموها RNA - II تكون مرافقة مع مصادر مختلفة من الفيرويدات. لقد وجد أن هذه المجموعة يمكن اكتشافها بتركيزات منخفضة جداً في جميع مصادر الفيرويدات التي درست بالإضافة إلى حاملي الفيرويد بدون أعراض والتي من المحتمل أن تكون أشجار أترج سليمة.

عند تحليل أوراق نبات الأترج الذي يظهر عليه أعراض بسيطة تتمثل في ظهور لون بني خفيف في قمة نصل الورقة وتكشف فقط في النباتات النامية تحت ظروف تغذية وحرارة مثلى، توحى بوجود فيرويد حمضيات CVD - IIa وهذا اكتشف بنفس الحركة في آل electrophoretic كما في RNA - II المذكور سابقاً. إن عمليات الاستبعاد باستعمال ٢ مول كلوريد الليثيوم واستبعاد الأحماض النووية باستعمال CF - 11 سييلولوز أظهرت أن CVD - IIa قد غسل على ٧٥٪ إيثانول STE. وبالتالي فإن الغسيل المستمر بمادة 30% ethanol - STE والاستبعاد بـ ٧٥٪ إيثانول STE سمح باكتشاف مخضيرات غنية بالفيرويد. بتحليل العينات التي أجزى لها electro - eluted بواسطة طريقة Sequential gel electrophoresis أظهرت وجود فيرويدات تنصف بالشكل الدائري والمستقيم.

عندما حقن أترج إيروزونا نوع S1 - 861 بفيرويد نقى من CVD - IIa حتى في أنواع الأترج التي تكون غالباً غير مظهرة للأعراض، فقد أمكن إسترجاع الفيرويد

ثانية من النباتات المحقونة بعد ٣ شهور. كذلك أمكن ملاحظة تلون بنى بسيط جداً على قمة نصل الورقة عندما حضنت النباتات تحت ظروف مثلى من الحرارة وطول النهار. هذا العرض كان قد صنف على أنه أبسط أشكال مرض الاكسوكورتز عندما يتفاعل فى الأترج. عندما حقن CVd - IIa فى نباتات الخيار فإنه أظهر تقزم شديد وتدللى الورقة والتفافها ولون أخضر داكن مغطى الورقة غير ظاهر فى النباتات غير المحقونة. أمكن استرجاع الفيرويد ثانية من نباتات الخيار المصابة بعد ثلاثة أسابيع من الحقن.

فى التقرير الأصلى الذى ذكره Duran - Vila et al سنة ١٩٨٦ أنه حسب طبيعة الفيرويد المذكور فى RNA II لا يمكن أن يظهر بوضوح وأن إمكانية إحتواء العائل للفيرويد قدرت مبدئياً. وعلى أية حال عندما أخذت تحضيرات حمض نووى من بادرات أترج لإريزونا 861، كانت متشابهة تحليلياً ولم يلاحظ أية شرائح لـ RNA فيرويدى. كذلك لم يمكن اكتشاف أحماض نووية RNAs فيرويدية بواسطة التحليل بطريقة PAGE فى تحضيرات من كلونات مختلفة تكاثرية لأترج أريزونا SI - 861.

إن المعلومات المتوفرة عن صفات الربط المختلفة للفيرويدات إلى السيليلوز والنتائج الملاحظة فى تجارب Duran - Vila et al سنة ١٩٨٨ توضح التقارير التى تذكر غياب RNA II فى تحضيرات الفيرويد نظراً لأن السيليلوز قد غسل بشدة بمادة 25% ethanol - STE وبالتالي إزالة CVd - IIa من تحضيرات الفيرويد، وبذلك فإن إفتراض أن RNA II هو فيرويد للعائل يجب أن يلغى وأن الاسم CVd - IIa يجب أن يستعمل لما كان يسمى سابقاً RNA II.

إن إعادة التحليل لعزلة CVaVd الذى قد وصف أصلاً بواسطة Schlemmer et al سنة ١٩٨٥ قد أظهر وجود فيرويد آخر هو (CVd - IIb) وهو ذو حركة electrophoretic مشابهة جداً إلى (لكن يختلف عن) CVd - IIa. باستمرار الأبحاث وجد أن CVd - IIb الذى هو فيرويد ككسيا (CCaVd) هو العامل المسبب

لمرض ككسيا Cachexia في الحمضيات هذا ما أكد عليه Semanik et al سنة ١٩٨٨ وكذلك Duran - Vila سنة ١٩٨٨ ، وبالتالي أمكن القول بأن هناك فيرويديين الأول Ila وآخر مشابه جداً له هو Iib.

عند حقن نباتات الأترج بعينات من فيرويد CCaVd = Iib - CVd ويضمن تحت مدى متطرف من الظروف لا تظهر أى أعراض ولكن الفيرويد يمكن استرجاعه دائماً من النباتات المحقونة وغير مظهرة للأعراض خلال ٣ شهور بعد الحقن. كان أول استبعاد للفيرويد CCaVd الذى هو CVd - Iib من إيثانول-CF 25% cellu lose 11 جدول ٢٩ وأظهر أعراض نموذجية لتلك المتسببة عن CVd Iia - على نباتات الخيار المحقونة. نتائج التهجين الجزيئى باستعمال منقب cDNA إلى CVd - Iib أكد بأن CVd - Iia و CVd - Iib فيرويدان منفصلان وبينهما تشارك بدرجة عالية من تماثل التسايع.

علاقة فيرويدات II - CVd مع فيرويد HSVd :

من الدراسات الحديثة التى أجريت على فيرويدات المجموعة الثانية من فيرويدات الحمضيات وعلاقتها مع فيرويد تقزم حشيشة الدينار Hop Stunt Viroid (HSVd) تبين أن هناك تسعة تنوعات تتبع لفيرويد HSVd ، من هذه التسعة هناك ثلاثة تنوعات تصيب الحمضيات. إن تنوعات HSVd التى تصيب الحمضيات لها صفات فيزيائية وحيوية تشابه مجموعة II من فيرويدات الحمضيات II - CVd. وهذه المجموعة كما سبق وذكرنا تتكون من Iia العامل المسبب لمرض الاكسوكورتز البسيط فى الحمضيات و Iib العامل المسبب لمرض ككسيا Cachexia فى الحمضيات. تحت ظروف الحقل فإن فيرويدات Iia تحدث تشقق بسيط فى القلف فى البرتقال ثلاثى الأوراق ولا تظهر أى تفاعل مع المانديلين ولا مع التانجالو. إن Iia تحدث تلون بنى فى قمة الورقة، تجعد عنق الورقة ونكروزز فى العرق الوسطى فى نباتات الأترج تحت ظروف الصويا المتحكم بها.

أما IIb فهو يسبب مرض ككسبيا في الحمضيات. تحت ظروف الحقل فإن هذا الفيروس لا يسبب ظهور أعراض على البرتقال الثلاثي الأوراق ولكنه يسبب تصمغ، تنقر في الخشب وتكتلات في الماندرين والتانجالو أما في الأترج وتحت ظروف الصوبا الزجاجية فإن IIb تتميز بإصابات مستترة (كامنة).

إن IIa و IIb تختلف في الحجم عن بعضهما البعض ببضعة نيوكليوتيدات، علاوة على ذلك فإنهما يسببان مرضين مميزين مختلفين على الحمضيات. التتابع في كل من IIa و IIb - CVd يمكن أن يثبت علاقة كل منها بالآخر وعلاقتهما مع تنوعات HSVd الخاصة بالحمضيات والمذكورة في اليابان، وتنوعات HSVd المترافقة مع العامل المسبب لتقرن الكريب فروت (HGda).

يُجرى عمليات التحليل المختلفة والحديثة تبين أن IIa قد تحدد بـ ٣٠٢ نيوكليوتيدة مشابهة لاثنتين من تنوعات HSVd الخاصة بالحمضيات من اليابان وتشارك أكثر من ٩٩٪ من تماثل التتابع مع الفيروسات اليابانية. هذه المجموعة من تنوعات HSVd ذكر أيضاً بأنها تسبب مرض اكسوكورز بسيط على بعض أنواع الحمضيات. كما وأن IIa تختلف عن IIb عن طرق إلغاء ثلاثة نيوكليوتيدات وتغيير مواقع إثنين من النيوكليوتيدات. هذه التغيرات يمكن أن تستعمل كعلامة لسرعة تشخيص IIb ولتمييزها عن IIa على مستوى النيوكليوتيدات عن طريق تكبير جزء صغير فقط من جينوم الفيروس. على موقع معين ضمن IIb تكون المنطقة المحتوية خمسة G ممتدة من نيوكليوتيدة رقم ١٠٦ إلى رقم ١١٠ مزودة هذا التغيير يتناسق في العزلات الأخرى للفيروس IIb. أربعة من النيوكليوتيدات المتغيرة تحدد في الفيروس في النطاق المتغير وواحدة في موقع ٥٨ في نطاق المرضية في الفيروس. هذه التغيرات يمكن أن تغير التركيب الثانوي في الفيروس IIb وتؤثر على المرضية للفيروس. هناك عزلات عديدة من IIb يجب أن يحدد تتابعها وتقارن لتحديد تأثير تغير التتابع على المرضية في أنواع الحمضيات المشابهة. إن دراسة التتابع يمكن أن

تؤدي إلى توضيح الصفات الحيوية المختلفة في IIa و IIb في عوائل الحمضيات المتشابهة. إن IIb و HGda على الرغم من حجمهما المتشابه فإنهما يمتلكان صفات بيولوجية مختلفة وأن هذين الفيروسين تشارك في ٩٦٪ من تماثل التتابع. بسبب الحجم وتشابه التتابع بين HGda و IIb فمن الممكن الآن التمييز بينهما على مستوى النيوكليتيده.

أما فيروس IIb والذي هو فيروس ككسيا للحمضيات فإنه يتكون من ٢٩٩ نيوكليتيده (شكل ٤١)، والذي هو نفس طول تنوعات HSVd الخاصة بالحمضيات والمرافقة تقزم الكريب فروت الذي ذكر في إسرائيل. (في دراسة Vila - Duran سنة ١٩٨٨ ذكر بأن IIa فيه ٣٠٥ نيوكليتيده وإن IIb فيه ٣٠٠ نيوكليتيده). إلا أن تتابع النيوكليتيديات في IIa و IIb تختلف عن تنوعات HSVd الخاصة بالحمضيات المعروفة في اليابان والتي تسمى CV₁ و CV₂ وذلك باختلاف مواقع ثلاثة قواعد C - G في موقع ٢٣، A - G في موقع ٢٦ و A - G في الموقع ٢٥١. أما IIb تختلف عن IIa عن طريق إختفاء G من الموقع ٥٨ و A من الموقع ١٠٩ و ١٢٢. كذلك فإن IIb تختلف أيضاً عن IIa في مواقع قواعد مستبدلة A - G في موقع ١٠٧ و U - C في موقع ١٩٣. أما تنوعات HSVd المترافقة مع عامل تقزم الكريب فروت (HGda) ذكر أن بها ٢٩٩ نيوكليتيده في الطول وتشارك أيضاً نفس القواعد المستبدلة من A - G على موقع ٢٦ في IIa و IIb. أما HGda فيختلف عن IIa و IIb عن ولكنه مشابه لتنوعات HSVd من اليابان عن طريق بقاء C على موقع ٢٣ و A على موقع ٢٥١. إن HGda مشابهاً لـ IIb عن طريق بقاء القاعدة المحذوفة G على موقع ٥٨ ولكن يختلف عن طريق بقاء A في موقع ١٠٧، ١٠٩ و ١٢٢ و بقاء U في موقع ١٩٣. إن HGda يختلف عن جميع ما ذكر سابقاً من فيروسات الحمضيات عن طريق إختفاء C من موقع ٢٤٦، U من موقع ٢٤٧ واستبدال A - G في موقع ٢٧١.

[illegible]

شکل رقم ۴۱ :

التتابع الكامل لنيوكلويدات الفرويدات الحمضية Ia و Kكسب، IIb. تنوع فريد تفرم حشيشة الدينار للحمضيات CV₁ و CV₂. إن تنوع فريد تفرم حشيشة الدينار من الكرب فروت مرافق مع عامل تفرم الكرب فروت HGda من اسرائيل. العلامات تدل على: Δ الاختلافات بين CV₁ و CV₂. أما (*) = الاختلافات في تنابع HGda الذي لا يوجد في الفرويدات الأرم الأخرى.

- * = اختلافات IIa و Cvd-IIb و Cvd-IIa مع CV₁ و CV₂.
 ↓ = إزالة من تابع Cvd-IIb عند مقارنته مع Cvd-IIa.
 += استبدال في تابع Cvd-IIb عند مقارنته مع Cvd-IIa.
 ↑ = اختلاف بين HGda عند مقارنته مع Cvd-IIb.

مجموعة CVd - III :

إن تحليل عزلات الاكسوكورتز في كاليفورنيا واسبانيا أظهر أن ٣٣ من أصل ٣٧ عزلة مختبرة تحتوى فيروسات ذات حركة فى الهجرة الكهربائية مشابهة لـ RNA - III. بتحليل عزلتين كل منهما لفيروس مفرد من كاليفورنيا أظهر أن هذين الفيروسين هما CVd - IIIa و CVd - IIIb وهما ذاتا حجم نموذجي ومماثل لـ ٢٩٠ نيوكليتيده. الاستبعاد المستمر من CF - 11 cellulose، أدى إلى التعرف بأن CVd - IIIa هو أول فيروس إستبعد بمادة إيثانول ٢٥٪، فى حين أن الفيروس CVd - IIIb إستبعد باستعمال ٢٠٪ إيثانول. كان هناك فيروسين آخرين هما CVd - IIIc و CVd - IIId حيث عزلا ونقيا من معقد عزلات من إسبانيا كان لهما معدل هجرة أسرع من CVd - IIIa و CVd - IIIb وثم إستبعدهما من CF - 11 cellulose باستعمال ٢٠٪ إيثانول كما فى جدول رقم ٢٩.

عند حقن الأترج بعينات نقية من CVd - IIIa ، IIIb ، IIIc أو IIId أظهرت تقزم معتدل ودرجات متعددة من تللى الأوراق، نكروز فى العرق الوسطى ونكروز فى عناق الورقة. هناك فيروسات مفردة أمكن استرجاعها ثانية من الأترج بعد الحقن بثلاثة شهور. لا يوجد عوائل أخرى غير أنواع الحمضيات يمكن أن تصيبها فيروسات مجموعة CVd - III.

مجموعة CVd - IV :

هناك عزلة واحدة مفردة تسبب أعراض بسيطة إلى متوسطة مصدرها كاليفورنيا (E 80) تحتوى فيروس CVd - IV وهى ذات هجرة كهربائية أكثر سرعة من أى عزلة فيروسية من أى مصدر من الحمضيات لوحظت حتى سنة ١٩٨٨. إن الهجرة الكهربائية Co - electrophoresis لهذه العزلة مع عينات من CVd - III بها عزلات، أدت إلى القول بأن CVd - IV لها معدل هجرة أعلى من مجموعة CVd - III. قدر حجم الجزيء فى هذه المجموعة بحوالى ٢٧٥ نيوكليتيده. إن مجموعة CVd - IV أظهرت عدم التجانس مع منقيات مجموعة CVd - I و II و III وأظهرت تجانس ضعيف مع CEVd cDNA.

عند حقن الأترج بتحضيرات نقية من Cvd - IV أظهرت أعراض تقزم بسيط، نكروز في العرق الوسطى وتدلى الورقة. أما عند حقن نباتات الخيار فلم يظهر أية أعراض عليها، ولكن يمكن استرجاع الفيرويد ثانية خلال ٣ أسابيع بعد الحقن. يمكن أن تصنف مجموعة Cvd - IV مع تلك الفيرويدات التي تزاوح أو تستبعد من السليلوز في ٢٥ % STE ethanol.

العلاقة بين فيرويدات الحمضيات

Relationship Among Citrus Viroids

عند حقن أشجار الأترج (السترون) بمزارع فيرويد نقى أو مخلوط فيرويد صناعي من فيرويدات الحمضيات، فإن جميع الفيرويدات تتناسخ مستقلة بذاتها، ولقد تأكد ذلك بواسطة التحليل بطريقة PAGE للنباتات المحقونة.

إن دراسة الأعراض المحدثة بواسطة خليط من المعديات الفيرويدية ومقارنتها مع الأعراض المحدثة بواسطة فيرويدات مفردة أدى إلى القول بحدوث تفاعلات حيوية أو تعاون Synergism بين هذه الفيرويدات. فمثلاً الأترج المحقون بالفيرويد- Cvd Ia، IIa و IIIa أظهر تقزم بسيط إلى متوسط وتجمع شديد في الأوراق عادة ما يكون مترافق مع الإصابة بفيرويد CEVd، بالإضافة إلى تدلى الورقة وتجمع عنقها وظهور نكروز على نصل وعنق الأوراق وهذا ما توصف به مجموعة Cvd - III و I - Cvd، وتختلف عن الإصابة بفيرويد CEVd في كون الأعراض تتمثل في صغر حجم الورقة، بينما أنصال الأوراق في النباتات المصابة بكل من I - Cvd و II و III كل على إنفراد كانت مشابهة لنباتات الكنترول غير المحقونة.

إن اللقاح الفيرويدي (المصدر الأصلي من كاليفورنيا E 821) والذي يحتوي على Cvd - Ia، IIa، و IIb و IIIb تحدث أعراض شديدة نوعاً ما مشابهة لتلك المحدثة بواسطة السلالات الشديدة المحتوية CEVd. هذه الأعراض كانت أيضاً أكثر شدة مما يمكن توقعه من إتحاد الأعراض المحدثة بواسطة كل واحد من هذه الفيرويدات

المشتركة، زيادة على ذلك حتى تحت ظروف الصوباء الزجاجية فإن الأعراض تزداد بشدة كبيرة خلال ظروف الصيف أو درجات الحرارة الأعلى وذات النهار الطويل، بينما النموات الحديثة النامية تحت ظروف الشتاء أو درجات حرارة أبعد ونهار قصير، يمكن أن تكون حاملة للفيرويد ولكن بدون أعراض، وبالمثل فإن الأعراض المرافقة لكل من CVd - IV و CVd - IIIa عند حقنها في الأترج كل على إنفراد أدت إلى تفاعل بسيط غير مشابه أبداً للأعراض المتوسطة الحديثة بواسطة عزلات كاليفورنيا E 804 التي تحوى كلا الفيرودين.

مقالة العالمين Semancik و Duran - Vila عن فيرويدات الحمضيات*:

إن التحليلات المقارنة بين عينات من الحمض النووي المأخوذ من الأترج المحقون بمصادر حقيلة عديدة مصابة بالفيرويدات قد أظهرت وجود الإنتشار الواسع لعديد من فيرويدات الحمضيات المميزة. إن فيرويد CEVd قد عرف ووصف وصفاً تاماً وذكر بأنه يتكون من ٣٧١ قاعدة نيوكليتيدي وقد اكتشف أصلاً من أشجار الحمضيات التي تظهر أعراضاً شديدة من التقزم وتقشر القلف. إن العوامل المسببة للأعراض المتوسطة والبسيطة على الأترج قد اكتشفت وعرفت حديثاً.

كذلك فإن ظهور الأعراض المتوسطة والبسيطة على نباتات الأترج المحقونة قد ثبت بأنها مترافقة مع واحد أو أكثر من الفيرويدات الأصغر من فيرويد CEVd. إن التحليل بطريقة PAGE والانجذاب على الكروماتوغرافى السيلولوزية CF - 11، والمدى العائلى والتهجين الجزيئى قد دعم فكرة تقسيم فيرويدات الحمضيات إلى خمسة مجموعات. كذلك فإن ظهور الأعراض التي يحدثها كل فيرويد أو مجموعة فيرويدات عند حقنها فى نباتات الأترج، أيضاً قد دعمت هذه الفكرة.

* ملاحظة: هناك علماء كثيرون درسوا فيرويدات الحمضيات هم ١ - N. Duran - Vila

٢ - C.N. Roistacher ٣ - R. River - Bustamant ٤ - J.S. Semancik ٥ - R. Flores ٦ -

J.M. Belles

إن الاصطلاح المستعمل والذي يذكر فيه اسم فيرويد الحمضيات فقط، فإن هذا لا يدل على فيرويد معين، لذا يجب أن يكون اسم فيرويد الحمضيات Cvd متبوعاً برقم المجموعة التي ينسب إليها وحجمه النسبي داخل المجموعة، حيث أن المجموعات أعطيت أرقاماً I، II، III، IV وضمن هذه المجموعات أعطيت نسباً لحجم الفيرويد مثل a، b، c، d. هذه التعبيرات، الأرقام والحروف يجب أن تفتقر باسم كل فيرويد للحمضيات ويستمر ذلك حتى يثبت له اسم غير هذا الاسم، كما حاول بعض العلماء في إسرائيل أن يثبتوا ذلك بالنسبة لفيرويد Cvd - Ib. لذلك عند ذكر اسم فيرويد معين بأنه العامل المسبب لمرض مميز فيجب أن يضاف إليه اصطلاح وصفي أكثر إيضاحاً. وبالتالي فإنه لغاية سنة ١٩٩١ فإن فيرويد إكسوكورتز الحمضيات وفيرويد ككسيا Cachexia فقط يمكن أن يشار إليهما كمسببات أمراض منفصلة.

إن فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd والتنوعات القريبة جداً له ذات ٣٧١ - ٣٥٧ نيوكليتيده والتي وصفت من قبل Visavader و Symon سنة ١٩٨٣، ١٩٨٥ تشكل مجموعة مستقلة من فيرويدات الحمضيات. هذه المجموعة تشمل العوامل المسببة المرضية لمرض اكسوكورتز الحمضيات وكذلك الأمراض المشابهة جداً له ولا تميز عنه إلا بشئ بسيط، وتشمل العوامل التي تظهر صفات مشتركة وتشابه في حجم الجزيء والمدى العائلي والتماثل المتقارب في التتابع. وبالتالي فإن مجموعة فيرويد اكسوكورتز الحمضيات يصعب التمييز بين عزلاتها أو سلالاتها إلا بالاختبارات الحيوية وإتباع طرق العزل المختلفة وسنذكرها في آخر المقال.

أما مجموعة Cvd - I فإنها تشمل فيرويديين من فيرويدات الحمضيات أصغر من فيرويد اكسوكورتز بمقدار ٣٠ - ٤٠ نيوكليتيده، وهما Cvd - Ia و Cvd - Ib. هذين الفيرويديين لهما حجم جزيئي يقارب ٣٣٠ - ٣٤٠ نيوكليتيده ودرجة عالية من تماثل التتابع وتحدث تكوروز على العرق الوسطى للورقة يكون بسيط جداً

وذلك عند حقنها فى نباتات الأترج. ومن المحتمل أن الفيروس الأصغر وهو- CVd Ib والذي وجد لغاية الآن فى عزلة من CVaVd فى كاليفورنيا يمكن أن يمثل تنوع غير معتبر من الفيروس Id - CVd.

إن التقرير الأولى عن فيروس يرمز له (CVaVd) كفيروس متميز بسبب إحداثه تفاعل متوسط شبيه بالاكسوكورتر على الأترج كان قد بنى على الاكتشاف الذى حدث لفيروس جديد يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيده عن طريق الصبغ بمادة برومايد الايثيديوم. الاسم المذكور Citron Variable Viroid كان قد ابتكر لوصف الطبيعة المتغيرة لتعبيرات الأعراض التى تنتج تحت ظروف بيئية مختلفة. وفى إعادة التحليل لعزلة CVaVd فقد تبين أنه بالإضافة إلى الفيروس ذو ال ٣٣٠ نيوكليتيده الأكثر انتشاراً فإن هناك ثلاثة فيروسات أخرى أمكن اكتشافها فى عزلة CVaVd. ونظراً لأن الاسم المعطى للفيروس Citron Variable Viroid كان قد بنى على تعبيرات حيوية معينة للعزلة التى تحتوى تركيب يتكون من أربعة فيروسات مميزة، فيبدو الآن أنه من غير الملائم إظهار أى من هذه الفيروسات الأربعة كعامل مسبب للتعبيرات المرضية بدون اختبار جميع احتمالات الاتحادات لمكونات CVaVd. زيادة على ذلك فإن الحقن بتحضيرات نقية من فيروس يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيده يحدث تفاعل أعراض توصف بأنها إنحاء فى الأوراق هذا يشبه Id - CVd. مع هذه المعلومات الجديدة عن عزلات CVaVd فنحن نقترح أن الاصطلاح الخاص وهو CVaVd يجب التخلي عنه وأن الفيروس الذى يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيده لعزلة CVaVd يجب أن يعرف على أنه Id - CVd.

إن الفيروسات الأصغر التى تهاجر بسرعة أكثر من مجموعة Id - CVd الموجودة والتى تظهر دائماً وكأنها سلسلة متصلة لحدوث الفيروسات طبعياً، هذه الهجرة الكهربائية المتقاربة جداً جعلت تمييز مجموعات Id - CVd - III، CVd - IV و CVd - II ممكن. مع ذلك فإن مجموعة Id - CVd يمكن تمييزها

بعض الصفات مثل خصائص الانجذاب للسيليلوز 11 - CF، الأعراض المحددة جيداً على الخيار والدرجة العالية من تماثل التتابع في النيوكلييتيدات. إن العلاقة بين مكونات هذه المجموعة وأمراض الاكسوكورنث والككسيا في الحمضيات قد ذكرناها بالتفصيل في مقال آخر. زيادة على ذلك فإن العلاقة القوية مع فيرويد تقزم حشيشة الدينار Hop stunt Viroid (HSVd) وفيرويد الثمرة الباهتة في الخيار والفيريود الجديد الذى عزل من الأترج وعلاقته مع HSVd كل ذلك له تأثير كبير في تحديد فيرويدات الحمضيات.

هناك فيرويدات عديدة تهاجر في PAGE d في المنطقة الضيقة المحددة بواسطة CVd - II (حوالى ٢٩٠ - ٣٠٠ نيوكلييتيدة) ومجموعة CVd - IV (حوالى ٢٧٥ نيوكلييتيدة). إن الأعراض المميزة لتجمع عنق الورقة متبوعاً بحدوث نكروزز والتي تظهر بوضوح على نبات الأترج المحقون بمجموعة CVd - III يمكن أن تستعمل كمميزات أولية للمجموعة CVd - III. إن جميع أفراد هذه المجموعة تحدث درجات مختلفة من تجمع عنق الورقة ونكروزز حيث أن هذا النكروزز بعد ذلك يمتد ويصل إلى العرق الوسطى ويصبح واضح بدرجة كبيرة وأحياناً يؤثر على العروق الثانوية. كذلك فإنها تسبب تدلى الورقة ويظهر على الورقة بشكل عام مظهر الورقة الساقطة وذلك نتيجة لانحناء عنق الورقة، كل هذه الأعراض تظهر في نباتات الأترج. إن المدى العائلى لهذه الفيريودات يمثل بشكل محدود في الحمضيات، وهي لا تظهر تماثل تتابع مع مجموعات CVd - I، CEVd أو CVd - II.

إن النتائج الأولية لإختبارات تماثل التتابع لمجموعة CVd - III يدل على أنها مجموعة متمائلة خاصة مميزة. ولكي نحصل على صفات أخرى كثيرة متوقعة لهذه المجموعة يجب إجراء إختبارات تهجين أخرى. نظراً لأن هذه الفيريودات تدخل أو تتواجد بعمار منخفض في الأترج المصاب فإن إختبارات التماثل لا يمكن إجرائها ما لم يتوفر كميات كافية من هذه الفيريودات.

أما فيروسات المجموعة IV فهي ذات هجرة كهربائية أسرع من كل المجموعات السابقة، وبالتالي فإنها تكون ذات فيروسات أصغر ويمكن القول بأنها أصغر الفيروسات التي تصيب الحمضيات وهذه المجموعة تحتوي فرد وحيد (لغاية ١٩٩٠) هو الذي يمثل هذه المجموعة. إنه يشارك في بعض صفات CEVd أكبر فيروسات الحمضيات. إن نبات الخيار هو العائل الشائع الذي يحمل الفيروس IV ويتكاثر فيه بدون إحداث أعراض ظاهرية (أيضاً يشبه تفاعل CEVd مع الخيار). إن المعلومات المتحصل عليها من عمليات التهجين تدل على قليل من تماثل التتابع. وعلى أية حال فإن الأترج المحقون بتحضيرات نقية من IV - CVd تظهر أعراض تدلى الورقة العشوائي ونكروزر في العرق الوسطى ولكن لا تظهر التقزم الشديد ولا تجعد الورقة التي تميز الإصابة بالفيروس CEVd.

نعود الآن لمجموعة CEVd والتي وعدنا أن نتكلم عنها في بداية هذا المقال. لقد تأكد أن أفراد مجموعة فيروس اكسوكورز الحمضيات CEVd تكون مترافقة مع مرض الاكسوكورز كما ذكر لأول مرة سنة ١٩٤٨ من قبل العالم Fawcett & Klotz. إن الفيروس المعروف جيداً والذي يتكون من ٣٧١ إلى ٣٧٥ نيوكليتيده يمكن أن يعزل من أشجار الحقل المظهرة أعراض الاكسوكورز المميزة. ونظراً لأن معظم مصادر الحقل تحتوي واحداً أو أكثر من الفيروسات بالإضافة إلى CEVd، فإن السؤال الذي يبرز الآن هو هل CEVd بنفسه هو المسئول عن مجموعة الأعراض المرضية الكلية؟ لا يمكن تحديد ذلك بشكل كامل.

إن الأشكال البسيطة من المرض التي تتميز عن طريق تقشر القلف وبدون تقزم أو يكون هناك تقزم بدون تقشر للقلف، هل هذه الأعراض راجعة بسبب الإصابة بالفيروس CEVd لوحده أو أنه غير مسئول لوحده في الحقل عن هذه الأعراض أو هل هناك فيروسات من مجموعات الحمضيات الأخرى تشارك في ذلك؟ هذا السؤال يحتاج إلى دراسات كثيرة تطبيقية في الحقل.

هناك تجارب على عوامل التقزم القابلة للانتقال بالتطعيم - Graft-transmissible dwarfing agents قد حصلنا على نتائج منها، هذه النتائج أظهرت أنه لا يوجد عزلات محددة مسببة للتقزم البسيط أو المتوسط موجودة ضمن CEVd ولكن ضمن فيروسات أخرى، هناك فيروس آخر من الممكن أن ينتقل إلى الأقحوان وبالتالي من المحتمل أن يكون له علاقة مع مجموعة Cvd - II. على أية حال فإن وجود التفاعلات الكاملة بين فيروسات الحمضيات لا تسمح، ما لم يحدد محتوى الفيروس، باستنتاجات مبنية على مميزات جزيئية لعزلات حقلية. وبالتالي فإنه فقط في كفاءة الأشجار المحقونة بفيروسات منفصلة وفيروسات متجمعة سوف تتحدد علاقة تأثير المسبب وتحديد من بين الفيروسات المختلفة للحمضيات وأخذ الأعراض بعين الاعتبار في ذلك التحديد.

وبشكل مختصر يمكن القول بأن المعلومات المتوفرة لدينا تزودنا بالقواعد الكافية لفهم جيد وتحديد مرض الاكسوكورتز. الأعراض البسيطة لا يمكن اعتبارها دليل تشخيصي لمرض الاكسوكورتز. مع أن الإختبار الحيوي للأكسوكورتز يمكن أن لا يستخدم لوقت طويل لايجاد إثبات إيجابي لوجود فيروس اكسوكورتز الحمضيات، إلا أنه يبقى أكثر قيمة لفهرسة العائل لهذا الفيروس. كما وأن العلاقة بين فيروسات الحمضيات والتعبيرات الكلاسيكية لمرض الاكسوكورتز الذي يظهر تفاعل على شكل تقشر القلب على الأصول الحساسة يجب أن تكون مقنعة في الاختبارات الحقلية للفيروسات المختلفة التي تستعمل كمزارع نقية بالإضافة لاستعمال مخلوط من الفيروسات في الحقن.

بعد أن إنتهى هذا المقال العلمي المقدم من أكبر عالمين من علماء فيروسات الحمضيات فإن المؤلف لا يستطيع أن يقول سوى أن التقدم العلمي السريع وانتشار أبحاث الفيروسات في كل مكان هو الذي يحدد مدى دقة هذه المعلومات ومدى استمرار صحتها في المستقبل ودعنا ننتظر.

فوائد الفيرويدات «توافق الفيرويدات مع أعراض التقزم القابل للانتقال بالتطعيم»

Association of Viroids With Graft - Transmissible Dwarfing Symptoms

من المعروف أن الفيرويدات والفيروسات تسبب أضراراً كبيرة في النباتات الاقتصادية تؤدي إلى خسائر كبيرة فلا يوجد أية فائدة منها. هناك استثناءان لهذه القاعدة، الاستثناء الأول هو احتمال التوصل إلى تطبيقات عملية ناجحة في المقاومة بالتضاد Cross - Protection في المستقبل القريب أو البعيد، وأما الاستثناء الثاني فهو خاص بالفيرويدات فقط وهو استعمالها في الحصول على أشجار متقزمة في الحقل وهذه الأشجار المتقزمة لها فوائد زراعية كثيرة، هذه الفكرة هي موضوع هذا العنوان.

هناك بعض الفيرويدات تسبب تقزم في الأشجار بدون أن يكون هذا التقزم مترافقاً مع أضرار أخرى، هذا التقزم يكون ذو فائدة عملية للمزارعين، هذه الفيرويدات قابلة للانتقال بالتطعيم وتسمى عوامل التقزم القابلة للانتقال بالتطعيم ومنها سلالات عديدة.

هناك في منطقة New South Wales في أستراليا أجريت تجارب على بعض العزلات المأخوذة من عزلات عوامل التقزم القابلة للانتقال بالتطعيم Graft - transmissible dwarfing agents (GTD agents) والتي تقلل حجم الأشجار الناتجة من بعض طرز البرتقال الناتجة من برعم *Citrus sinensis* مطعوم على برتقال ثلاثي الأوراق *Poncirus trifoliata* وبدون أن يكون لها تأثيرات ضارة. مثل هذه الأشجار المتقزمة تكون ذات فائدة اقتصادية حيث أن تكاليف العمليات الزراعية مثل الرش والجمع تكون أقل من تكاليف الأشجار الكبيرة الضخمة، وكذلك فإن الأشجار المتقزمة يمكن أن تزرع بكثافة أكثر وبالتالي تعطى إنتاج أكثر في السنوات الأولى

من الإنبات، زيادة على ذلك يكون هناك كفاءة أكثر في الاستفادة من الماء في الري والأسمدة. وبالتالي يمكن القول بأن التقزم القابل للانتقال بالتطعيم (GTD) هو عبارة عن تفاعل بين العائل والكائن الممرض تكون النتيجة فيه لصالح المزارعين.

إن التطبيقات التجارية لهذه العملية GTD قد بدأت في استراليا ولكن يجب أن لا نأخذها مباشرة بل يجب أن نتأكد من تعريف هذه العوامل الممرضة بالضبط والعوامل التي تؤثر على تفاعلها مع العائل وهل هذه العوامل الممرضة تحدث هذا التفاعل باستمرار دون أن يكون عرضياً وهل الظروف البيئية السائدة لها تأثير في هذه العوامل أم لا. إذن نحن نتكلم عن هذا الموضوع من ناحية علمية أما من ناحية تطبيقية في بلادنا أو أى بلاد أخرى فهذا يحتاج إلى أبحاث تقرر ذلك.

إن أعراض التقزم في أشجار الحمضيات المضمومة على أصول البرتقال ثلاثي الأوراق قد عزيت إلى فيروس أكسوكورتز الحمضيات CEVd في الولايات المتحدة واستراليا وذلك بسبب أن الأكسوكورتز يسبب تقشر قلف الأصل بالإضافة إلى التقزم وكذلك فإنه ينتقل بالتطعيم. وعلى أية حال فإن الأشجار المتقرمة بدون أن يحدث لها تقشير نتيجة الإصابة بالفيروس قد لوحظت في استراليا وإيطاليا وأمكن نقل هذه الأعراض بالبرعم من الأشجار الاسترالية إلى غيرها بدون أن يحدث أعراض تقشر. إن معظم عزلات GTD المستعملة في بساتين الفاكهة في استراليا من النوع الذى يحدث تقزم بدون تقشير.

هناك دليل أولى مادي تفصيلي يدل على أن CEVd يكون مترافقاً مع التقزم في حالة العزلات GTD غير المقشرة. إن خمسة من ستة عزلات أعطت تفاعل تجعد الورقة في السترون C. medica الكاشف لفيروس CEVd. كما أمكن عزل ستة عزلات من التي تحدث تقزم بدون تقشير للقلف من أشجار البرتقال وتبين بعد النقل المتكرر أنها دائماً مرافقة لأعراض التقزم بدون تقشير. يلاحظ أعراض هذه العزلات في شكل ٤٢. ولغاية الآن لم يحدد تتابع هذه العزلات أو عدد

نيوكلييتيداتها وهل هي مقتصورة على فيروس CEVd لوحده فقط أم أنها مشتركة مع فيروسات أخرى من المجموعات المختلفة لفيروسات الحمضيات. هناك عزلة واحدة تسبب التقزم والتقشير معاً.

إن نتائج هذه الأبحاث تدل على أن الفيروسات تكون دائماً مترافقة مع التقزم في أشجار البرتقال. وقد وجد أن بعضاً منها يسبب أعراض تجعد الأوراق في السترون (الأترج). أحياناً فإنه يمكن أن تطعم الأشجار بالبرعم إلا أنها لا تعطى أعراض التقزم المميزة للعزلة، يعود ذلك إما إلى عدم وجود الفيروس في جزء البرعم المأخوذ كطعم للأصل أو عدم ملائمة الظروف سواء جوية أو حيوية لتناسخ الفيروس.

ذكرنا سابقاً أن هناك عزلة تعطى أعراض تقزم مع تقشر على البرتقال ثلاثي الأوراق هذه العزلة أعطيت رقم ٣٣. أما العزلتين ٣٥٣٥ و ٣٥٣٦ فهي تعطى تقزم بدون تقشر ولكن عند حقنها في السترون تعطى أعراض نموذجية لفيروس CEVd على السترون و Gynura والطماطم (هذه العزلات الثلاثة تسمى S - isolates) ولكن أعراضها تكون أبسط من أعراض السلالة CEVd - A.

أما الأربعة عزلات الأخرى تسمى M - isolates وهي ٣٥٣١، ٣٥٣٢، ٣٥٣٨، ٣٥٣٩ عند حقنها في السترون تعطى أعراض تجعد الأوراق البسيطة ويتأخر كثيراً هذا الكشف (تكشف الأعراض) بالمقارنة مع تفاعلات CEVd. هذه العزلات لا تعطى أية أعراض على الـ Gynura أو الطماطم. لقد وجد أنه من الصعوبة بمكان تمييز عزلات M - isolates عن بعضها البعض إلا أنها متميزة عن S - isolates هذا يؤدي إلى القول بأنها إما أن تكون أشكال معتدلة من CEVd والتي من الصعب تمييزها عن بعضها البعض أو أنها تتبع فيروس منفصل عن فيروس CEVd.



شكل رقم ٤٢ السفلى:

تفاعل عزلات S - على الطماطم والجينورا.

A : نباتات طماطم محقونة بالعزلة 033. أعراض تقزم متوسطة على الشمال أما اليمين غير معاملة.

B : نبات جينورا محقونة بالسلالة 033 مسببة أعراض شتند معتدلة.

النباتات الموجودة داخل المستطيل تظهر أعراض الإصابة بسلالة A - CEVd تحت نفس الظروف.

شكل رقم ٤٢ العلوى:

A : نباتات سترون مظهرة أعراض شديدة للإصابة بعزلة GTD على اليسار

مقارنة مع نباتات غير مظهرة للأعراض على اليمين.

B : أعراض معتدلة منتجة بالعزلة 3532.

ب - أمراض الحمضيات الفيروسية

١ - مرض اكسوكورتز الحمضيات (تشقق الحمضيات)

Citrus Exocortis Disease

يعتبر مرض تشقق القلف في أشجار الحمضيات عالمي الانتشار ويهاجم البرتقال ثلاثي الأوراق و Rangur ، Citrango وأنواع أخرى من الليمون والليمون الحلو، بعض أنواع ليمون الاضاليا والترنج. إن كلاً من البرتقال وليمون الاضاليا والكريب فروت وأشجار الحمضيات الأخرى المطعومة على أصول حساسة لمرض تشقق القلف تظهر إنخفاضاً في النمو يتراوح من نسبة بسيطة إلى نسبة تصل ٥٠٪. ويخفض الإنتاج بنسبة تصل ٤٠٪.

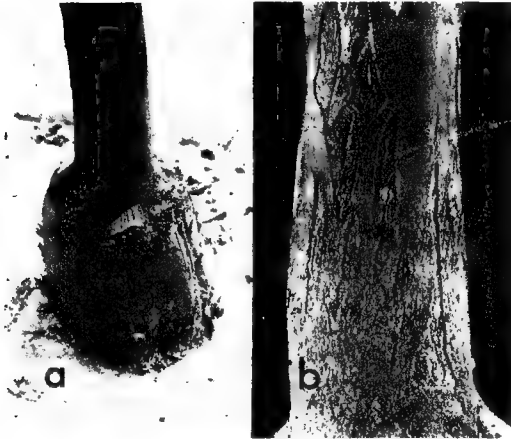
الأعراض:

يظهر على النباتات المصابة الحساسية للمرض تشققات عمودية في القلف وتكون ضيقة، وتخطيطات رفيعة عمودية على القلف الخارجى المفكك جزئياً والتي تغطي القلف مظهر التقرح أو المظهر الحشوفي (شكل ٤٣). نظراً لأن كثيراً من النباتات القابلة للإصابة بالمرض مثل البرتقال ثلاثي الأوراق، تستعمل أساساً أصول لتطعم عليها أشجار حمضيات أخرى، وبسبب أن الطعوم تعطى نمو ضعيف على مثل هذه الأصول وبسبب الأصول الحشوفية واسعة الاستعمال، فإن المرض أعطى اسم القورمة الحشوفية Scaly butt. إن النباتات المصابة الحساسية للمرض يمكن أيضاً أن يظهر عليها تلطخات صفراء على السيقان الحديثة المصابة، بعض أنواع الترنج يظهر عليها التفاف الأوراق والسيقان إلى الداخل وتشقق واسوداد أعناق وعروق الورقة. تظهر جميع النباتات المصابة، بشكل عام، متقزمة هذا التقزم يتراوح من نسبة بسيطة إلى مدى كبير وتعطى إنتاج منخفض. شكل ٤٤.

الكائن المعرض:

يتسبب هذا المرض عن فيروس تشقى قلف الحمضيات-Citrus Exocortis Vir oid ويكتسب باختصار CEVd (وقبل سنة ١٩٩٢ كان يكتب بدون إضافة حرف d). يبدو أن الفيروس يشابه ظاهرياً فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس وهو يتكون من حمض نووى RNA ذو خيط واحد يتألف من ٣٧١ نيوكليتيده أما سلالته فتتكون من ٣٧٠ - ٣٧٥ نيوكليتيده ويكون ذو وضع (شكل) دائرى أو مستقيم، وهو لا يشابه فيروس الدرنه المغزلية فى كثير من الصفات.

ينتقل الفيروس بسهولة من الأشجار المريضة إلى الأشجار السليمة عن طريق سكاكين التطعيم، مقصات التقليم أو أدوات القطع الأخرى. ينتقل بواسطة الأيدى ويمكن أن ينتقل بواسطة الحيوانات القارضة والحافرة. ينتقل الفيروس أيضاً بواسطة الحامول وينتقل بواسطة العصارة إلى كل من الجنسين *Gynrua* و *Petunia* وإلى نباتات عشبية أخرى. يحتفظ الفيروس بمقدرته على الإصابة وهو على صفائح السكاكين الملوثة لمدة لا تقل عن ثمانية أيام. عندما ينقى الفيروس جزئياً فإنه يبقى قادراً على إحداث الإصابة على درجة حرارة الغرفة العادية لعدة شهور. إن درجة الحرارة المميتة لهذا الفيروس فى العصارة المستخرجة حوالى ٨٠م لمدة عشرة دقائق، ولكن الفيروس المنقى جزئياً يبقى قادراً على إحداث العدوى حتى بعد أن يغلى لمدة ٢٠ دقيقة. يبقى أيضاً الفيروس حياً بتسخين السكاكين الملوثة فترة قصيرة فى اللهب فى مشعل البروبان (درجة حرارة النصل حوالى ٢٦٠م) وفى السكاكين المخمورة فى الكحول والمسخنة فى اللهب. يبقى الفيروس أيضاً حياً على السكاكين الملوثة المعاملة بمعظم المطهرات الكيماوية الشائعة باستثناء محلول صوديوم هايوكلورايت.



شكل رقم ٤٣ :

تقشر القلف والتشقق المتسبب عن فيروس الاكسوكورتز في الحمضيات.

A: نمو محدود للبريقال الحلو وتقشر القلف على أصول يرتقال ثلاثى الأوراق.

B: تشقق ساق الليمون الحلو.



شكل رقم ٤٤ :

أعراض فيروس الاكسوكورتز على السرون - الشمال، سرون غير محقون. أما اليمين، أشجار سرون مصابة بفيروس اكسوكورتز الحمضيات، يلاحظ التفاف الأوراق ومراحل مبكرة من تشقق القلب.

تكشف المرض:

يقي الفيروس حياً في معظم أشجار الحمضيات وفي كثير من الحوائل العشبية وينتقل إلى نباتات الحمضيات عن طريق التطعيم بالبرعم أو أنواع التطعيم الأخرى (التطعيم بالقلم) وينتقل أيضاً بواسطة أدوات القطع الملوثة أو الآلات الزراعية الأخرى. يبدو أن الفيروس يدخل بوضوح في عناصر اللحاء وينتشر فيها في جميع أجزاء النبات. يبدو أن الفيروس يكون مترافقاً مع الأنوية والأغشية الداخلية من خلايا العائل، وهذا يؤدي إلى اضطرابات في الأغشية البلازمية. مع أن الفيروس يبدو وأنه

فأفقد القدرة على أن يعمل جزيئات ناقلة messenger molecules أو أن يعمل كحمض نووي مستقل، إلا أنه يسبب تغيرات عديدة في ميثابولزم النباتات المصابة هذه التغيرات تشمل زيادة في الأكسجين المحتص وفي التنفس وأيضاً في محتوى السكريات، وفي بعض الأنزيمات تحدث تغيرات ملحوظة وكذلك أيضاً في عديد من الأحماض الأمينية.

المقاومة :

يمكن مقاومة مرض تشقق قلف الحمضيات فقط عن طريق إكثار أشجار المشتل الخالية من هذا المرض من أصول مؤسسة مشهود بصحتها وخلوها من المرض واستعمال التطعيم بالبرعم النظيف الخال من المرض. وكذلك المشتل يجب أن تكون خالية من المرض وإتباع عمليات زراعية نظيفة. يجب أن تطهر الأدوات بين كل قطعتين في نباتات مختلفة وذلك بغمر الأدوات في محلول ١٠ - ٢٠ % صوديومهايوكلورايت.

المدى العائلي (الكواشف) :

يصيب الفيروس بالإضافة إلى مدى واسع من أصناف الحمضيات، النباتات الآتية:-

1 - *Tagetes patula*. 2 - *Lycopersicon esculantum* 3 - *Gynura aurantica*

4 - *Chrysanthemum morifolium* 5 - *Persea americana* 6 - *citron medica*.

تأثير فيروس اكسوكورتز الحمضيات على تركيب الأزهار والثمار في الأترج:

يستعمل نبات السترون (الأترج) *Citrus medica* كنبات كاشف لفيروس اكسوكورتز الحمضيات. تجرى عملية تكاثر الأترج عن طريق تنمية بادران

الصنف 861 Arizona وعقل أو نباتات صغيرة مطعومة بالبرعم من طراز S-1 كلاهما يستعمل باستمرار كاف لتكنيك الفهرسة ولكن في الوقت الحاضر يفضل استعمال عقل من S-1.

إن أعراض الإصابة بفيرويد اكسوكورتز الحمضيات على سترون أريزونا 861 أو S-1 تشمل الإصفرار ثم تدلى الأوراق الحديثة والمتكشفة الجديدة، تقلن العرق الوسطى (يظهر بقع فلينية) والعروق الجانبية الكبيرة على السطح البطنى للورقة ويظهر بقع عمودية مستقيمة على الساق.

في ربيع سنة ١٩٨٥ أخذت عقل من السترون S-1 مصابة بعزلة شديدة من فيرويد اكسوكورتز الحمضيات إحتفظ بها في الصوبا الزجاجية لأكثر من سنة. هذا الاحتفاظ أعطى فرصة للعقل المصابة بأن تزهر وتعد الثمار هذه الحالات لم تلاحظ قبل ذلك. عند فحص وملاحظة تركيبات الأزهار والثمار في النباتات المصابة تبين ظهور أوضاع غير طبيعية في هذه الأعضاء لم تكن ملاحظة من قبل ولم تذكر المراجع بأنها ترافق الإصابة بفيرويد اكسوكورتز الحمضيات.

لقد وصف الشكل الخارجى لازهار الحمضيات السليمة وهو ظاهر في شكل ٤٥. في الازهار السليمة الطبيعية يتفتح التويج بنظام التفتح القاعدى وتبقى قواعد البتلات ملتصقة مع قاعدة الكأس حتى بعد التلقيح. أما في النباتات المصابة فإن معظم الأزهار تتميز عن طريق بقاء التويج سليماً قبل أو أثناء أو بعد التلقيح ولا تفتح البتلات طبيعياً، وبدلاً من التفتح الطبيعى تبقى ملتصقة في قمة التويج وينطلق التويج بأكمله من القرص الزهرى كلما تكشف وكبر المبيض. تنفصل البتلات عند قاعدة التويج وأحياناً تتسع تدريجياً إلى حد ما بحيث تأخذ شكل النجمة، وبسبب جفاف النصف العلوى من التويج فإنه يشكل غطاء على شكل

فنجان يغطي النهاية القلمية في الثمار غير الناضجة بحيث يبقى عدة شهور (شكل ٤٥، B).

مع أنه لا يوجد دراسات تشريحية على هذه الأوضاح، إلا أنه يحدث اضطرابات في تركيب الزهرة وفي تكشف المبيض ويظهر ثمار ناضجة وأخرى غير ناضجة ولكن كليهما بنضج غير طبيعي. مع أن الكأس في الأزهار المصابة يظهر وكأنه طبيعي التركيب، إلا أنه يكون أضيق من الوضع الطبيعي وهذا يؤدي إلى الافتراض بأن الكأس يكون أكثر التصاقاً مع الجزء العلوى من القرص الزهرى (شكل ٤٥، B) أكثر مما هو موجود في الأزهار العادية السليمة. وفي الحقيقة فإن هذا الالتصاق قد يكون محكم جداً ومقيداً للتكشف الطبيعي للبويضات والمبيض. كلما تكاثرت الخلايا وتوسعت تأخذ مكان في عملية تكوين الهسبريديم الناضج شكل ٤٦. يبدو أن هذا الانطباق يكون مركزاً على قمة السبلات وبالتالي يحدث تقريباً في منتصف البويضات أو المبيض إنقباض يكون هذا الانقباض شديد أحياناً وبسيط أحياناً أخرى (شكل ٤٧) ويكون دائماً مساوياً لتأثير تخليق شديد في الحالات الشديدة. الاستجابة النهائية لتأثير هذا التخليق تكون بحيث تأخذ الثمرة الشكل المشوه بدرجات مختلفة ويكون ذلك على شكل الساعة الرملية (شكل ٤٧) وهو أكثر الأعراض شيوعاً. يكون النصف القلمى للثمرة أصغر من المنتصف الساقى للثمرة وفي بعض الحالات يكون أكثر كثيراً. أيضاً فإن بعض الثمار يكون موجهاً بشكل قائم على المحور، البعض الآخر من الثمار يتحرف عن هذا الوضع القائم عن النصف القلمى ثم تنحى الثمرة عن المستوى المتعامد. تكون الثمار المصابة بشكل عام أصغر من الثمار السليمة وتميل لأن تأخذ اللون الأصفر قبل النضج. أما الثمار المصابة بشدة يمكن أن تأخذ ربع حجم الثمار العادية. إذا عمل مقطع طولى أو عرضى في الثمار المصابة يبدو واضحاً أن البويضات تكون قد أصيبت (شكل ٤٨). وعلى أية حال فإن الثمار المصابة تكون صغيرة ومشوهة ويمكن أن تحتوي

أكثر من ١٠٠ بذرة صغيرة بدائية والتي لن تتكشف إلى بذور طبيعية مهما طال بها الزمن. وعلى النقيض من ذلك فإن الثمار المصابة بشكل معتدل عندما تصل إلى طور النضج تصل إلى طول حوالى ١٠ سم ويكون فيها ٢٠٪ من البذور سليمة، هذه البذور تكون جاهزة للإنبات وتنتج نباتات سليمة بدون ظهور أعراض. أما البقية الباقية من البذور والتي هي ٨٠٪ لن تنمو أكثر من ٢ ملم وهذه البذور البدائية لن تتكشف إلى بذور عادية كما سبق وذكرنا. جميع المحاولات التي تبذل لتسهيل إنبات البذور المأخوذة من نباتات مصابة بشدة بفيرويد اكسوكورتر الحمضيات أو بعزلات معتدلة منه فشلت فى إنتاج نباتات سواء فى التجارب المعملية أو فى الطبيعة. الثمار السليمة S-1 يكون فيها عديداً من البذور الحية والتي تنمو فعلياً بنسبة ١٠٠٪. وبالتالي فإن توقف نمو البذور فى سترون S-1 يبدو وأنه مظهر مهم فى فهم أوضاع البذور الشاذة لأن هذه البذور يجب أن تكون مصابة بدرجة كبيرة وبالتالي فإنها على الأقل تشارك ولو جزئياً فى غياب أو الانخفاض الكبير فى حدوث الانتقال بالبذور للفيرويد CEVd.

إن هذه الأعراض المذكورة سابقاً لم تؤثر على أى نوع تجارى يزرع من الحمضيات ويصاب بالفيرويد CEVd. وفى الحقيقة فإن قوة الشجرة بالإضافة إلى حجم الثمار ونوعيتها لا يبدو بأنها تتأثر عندما يكون الفيرويد موجوداً فى أصول متحملة للمرض. كذلك لم يلاحظ أى من هذه الأعراض المذكورة سواء على أشجار سترون S-1 السليمة النامية من عقل أو الأشجار المحقونة بفيرويد Citron Variable Viriod والذي تتميز الإصابة به على شكل أعراض على المجموع الخضرى تكون بسيطة، مع ذلك تكون مشابهة للأعراض المنتجة بواسطة CEVd، وبالتالي فإن التعبيرات بالأعراض المرضية المذكورة فى الأزهار والثمار يمكن أن يعتقد بأنها متخصصة بالإصابة بالفيرويد CEVd.

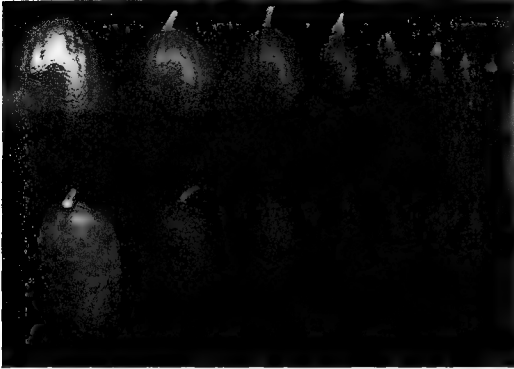


شكل رقم ٤٥ :

A : زهرة سترون سليمة طبيعية.

B : زهرة غير طبيعية للسترون من نباتات مصابة بفيروس CEVd.

C : الملقحة (اليسار) مرتبطة مع الكأس وقاعدة قرص الزهرة غير الطبيعي من زهرة سترون مصابة بالفيروس وغير طبيعية. (أما اليمين) فإنه نفس التركيب لزهرة سليمة. الأسهم تشير إلى شفة الكأس.



شكل رقم ٤٦ :

العلوى: تطور نمو ثمار السترون السليمة من اليمين إلى اليسار.
السفلى: نفس تطور الثمار ولكن مصابة بفيروس أكسوكورتز الحمضيات.



شكل رقم ٤٧ :

أمثلة من التشوهات والاضطرابات التي تحدث في ثمار السترون في مراحل إصابة مختلفة.
تعبيرات مرضية للفيروس أكسوكورتز الحمضيات.



شكل رقم ٤٨ :

A : مقاطع طولية في ثمار الحمضيات مصابة بالفيروس CEVd مظهرة مراحل مختلفة من درجات التشوه ونقص في عدد البذور وحيرتها مع زيادة شدة التشوه.
B : مقطع طولى في ثمار سليمة .

التغيرات في جدار الخلية نتيجة الإصابة المرضية:

تتميز الخلايا البرانشيمية الحديثة في قمم الأوراق من النباتات السليمة *Gynura aurantiaca* بجدر خلوية ذات مقطع جانبي منتظم وسماكة منتظمة (شكل ٤٩؛ b). كما ينعكس ذلك بواسطة المقارنة في (شكل ٥٠). إن جدر الخلية في مناطق المقارنة في الأوراق المصابة بالفيروس CEVd تشوه بشكل كبير نتيجة شكل غير منتظم في الخلايا في هذه المناطق من النسيج المصاب. المقاطع الجانبية لجدر الخلية المتناظرة تظهر متجمعة وذات سمك غير منتظم (٤٩؛ a، c). على المقابل من هذه الجدر الخلوية الشاذة يظهر أحياناً حزم عريضة متوجهة في منطقة الصفيحة المتوسطة حتى في الحالات التي يكون فيها جدار الخلية نفسه غير مشوه، هذه التغيرات في جدار الخلية عادة ما تؤدي إلى تشوه في التركيب وقساوة في الخلايا نفسها. كذلك فإن الإصابة الفيروسية يمكن أن تغير شكل البلاستيدات الخضراء والأنوية.

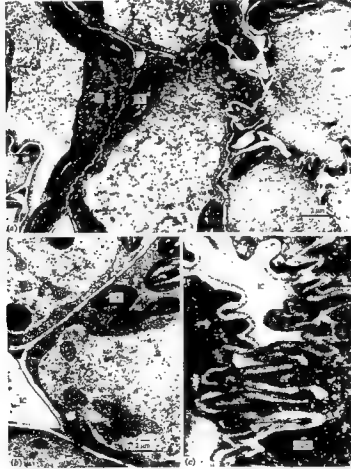
التغيرات المرضية في الأغشية الخارجية للبلازمودسيمات:

Pathological Changes of Plasmalemmasomes

إن ال Plasmalemmasomes سوف نرمز لها بحروف (PMS) هي عبارة عن بروزات من ال Plasmalemma في السيتوبلازم وتسمى أيضاً الغشاء الخارجى للبلازماليمما. وهي تظهر بحيث تكون طبقة من الأغشية مضاعفة وتتكون من

البلازماليمما Plasmalemma وتونوبلاست وهذه التركيبات PMS توجد بشكل عام في جميع أنواع الخلايا الحديثة المتكشفة شاملة عناصر الأنايب الغريالية - القصبيات - الخلايا المرافقة والخلايا البرانشيمية في اللحاء والخشب والخلايا الكولنشيمية في الميزوفيل والايديرمز.

قبل أن نتكلم عن تأثير الفيرويد على ال PMS نذكر الوضع السليم لهذه المناطق ثم نقارن ذلك مع الوضع في حالة الإصابة بالفيرويد.



شكل رقم 49 :

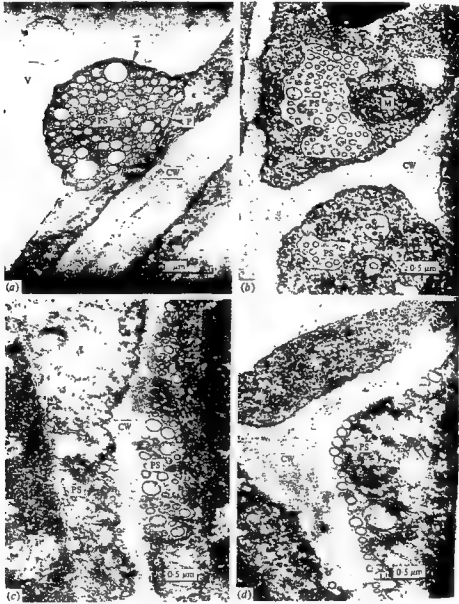
صورة الكترونية للخلايا البرانشيمية من نسيج ورقة سليمة (b) ومصابة بالفيرويد CEVd شكل (a, c) على نباتات *G. aurantiaca* Ch = كلوروبلاست. IC = فجوات بين خلوية. N = نواة. V = فجوة في خلوية النبات.

١ - ال PMS فى النسيج السليم:

يمكن تقسيم ال PMS بالاعتماد على التركيب الداخلى إلى نوعين مميزين، الأول يسمى حوصلى والثانى أنبوى، كلاهما موجود فى نبات *G. aurantiaca* السليم. يتميز النوع الحوصلى بوجود حوصلات داخلية مصفوفة بانتظام، متوسط قطرها ٩٠ نانومتر وتكون مملوءة بمواد متغايرة بشكل بسيط. تتشكل هذه التراكيب بحيث تكون وسيطات ذات أشكال مختلفة من الشكل الكروى المنضغط أو تتكون بشكل تركيبات منبسطة بين البلازمليما وجدار الخلية وهذه تكون سهلة الاكتشاف. ويمكن أن تكون موجودة بشكل آخر بحيث تكون على شكل طبقات مضاعفة أو مفردة من الحوصلات توجد فى الخلايا الحديثة حيث يلاحظ زيادة فى سماكة الجدار فى الخلية. يمكن أن يظهر فى المقاطع المتسلسلة فى الخلايا أن ال PMS يمكن أيضاً أن تتواجد بشكل منفصل عن جدار الخلية وحررة فى السيتوبلازم.

أما ال PMS الأنبوية فهى تتصف بأنها مجموعة مفككة من تركيب الأنابيب الداخلية. هذه الأنابيب تكون بشكل عام مصفوفة بطريقة مكثفة ومتوسط قطرها ٥٠ نانومتر. فى كثير من ال PMS الأنبوية فإن جزءاً من التركيب الداخلى يصبح مقلوباً إلى كثافة الكترونية وحييات Paramural. هذا يعنى أن ال PMS تكون محبة. هذه المادة ذات الكثافة الالكترونية يمكن أيضاً أن تصبح موزعة فوق مساحة كبيرة من البلازماليما وجدار الخلية وهذا يؤدى إلى القول أن ال PMS تكون فارغة وذات تركيب متنكس ببطء. كثيراً من ال PMS تظهر ذات أغشية داخلية عديدة الطبقات.

هناك ملاحظتين يجب الاهتمام بهما فى هذا الموضوع، الأول: - إن ال PMS الحوصلية والأنبوية لا يتواجدان فى وقت واحد فى نفس العينة النباتية. الثانية: - ضمن العينة النباتية الواحدة فإن المناطق المختلفة يمكن أن يكون بها اختلافات واضحة فى عدد وتوزيع هذه ال PMS وبالتالي فإن سلسلة من المقاطع الرقيقة يمكن أن تجرى فى المكان وغالباً يصعب اكتشاف ال PMS، إلا أنه بعد



شكل رقم ٥٥:

صورة الكترونية دقيقة للبلاسماليماسومز الوعائية في أنسجة سليمة من نباتات *G. surattense*.
 تكون الأوعية مقفلة في شكل دائري (a) الذي يمكن أيضاً أن توجد ضمن السيتوبلازم (b). في
 المناطق التي زاد فيها سمك جدار الخلية تكون الأوعية مرتبة بتضاعف (c) أو طبقات مفردة (d).
 جدار الخلية = CW = ميتوكوندريا، P = بلازماليماسوما، PS = بلاسماليماسوما، T = تونوبلاست،
 V = فجوة.

إجراء عدة مقاطع فإن هذه التركيبات يمكن أن تظهر ثانية ولكن ليس أكثر من ستة منها يمكن أن تلاحظ في المقطع الواحد. ولكي نحصل على معلومات كثيرة عن هذه الـ PMS يكون ذلك فقط إذا أجرى عدد كبير من المقاطع الرقيقة من نباتات مختلفة تحت الاختبار.

الـ PMS في نسيج الورقة المصابة بالفيروس CEVd :

إن الـ PMS في نسيج الورقة المصابة بالفيروس CEVd تختلف بشكل كبير في شكلها وتركيبها الداخلي عن تلك الموصوفة في الأوراق السليمة. في جميع الحالات حيث أن التركيب الداخلي الحوصلي يمكن أن يتحقق ويؤى بالتجربة فتظهر هذه التركيبات في الخلايا المصابة بعدم انتظام واضح في حجمها - شكلها وعددها. بسبب هذه الانحرافات فإن الشكل الكلى لـ PMS يصبح أيضاً غير منظم.

أما الـ PMS الأنبوبية في الأوراق المصابة يظهر فيها اضطرابات كثيرة في الأنابيب الداخلية والتي يبدو وكأنها مطبوعة مع بعضها. العناصر التركيبية يكون لها كثافة الكترونية ثقيلة، وبالتالي فإن الـ PMS الأنبوبية المشوهة يكون بسهولة أن ترى قريبة من أكثر جدر الخلية نفاذية وقريبة من السيتوبلازم.

يلاحظ في كثير من الأحيان نوع واحد من الـ PMS مشوهاً في النباتات المصابة بالفيروس ويصعب اكتشاف انتشار التركيبات الداخلية من الـ PMS بين البلازمالما وجدار الخلية كما هو في النسيج السليم. يجب التأكد أنه في الإصابة الفيرونية فإن الأوراق الحاملة أعراض يظهر فوق جدار الخلية فيها مناطق تبدو سليمة وكذلك فوق الـ PMS، هذا يدل على أنه في الأوراق ذات مظهر الإصابة العام فإن مناطق من النسيج السليم يمكن أن تتواجد على سطح الورقة.

لا تظهر تغيرات محدقة بواسطة الإصابة الفيرونية في تركيب كل من الأنبوبة، الميتوكوندريا، الرايوسومات، المكروسومات وجهاز الغشاء السيتوبلازمي. أحياناً فإن

بلاستيدات خضراء مع أجسام غير منتظمة ذات كثافة الكترونية تتواجد في الأوراق المريضة. ومن المهم أن نذكر هنا أن هذه الانحرافات تمثل أيضاً أكبر الأعراض الخلوية في نباتات *G. aurantiaca* المصابة بفيروس الثمرة الباهتة في الخيار.

تأثير الإصابة بفيروس اكسوكورتز الحمضيات على إنتاج الأثيلين:

إن فيروس اكسوكورتز الحمضيات يمكن أن ينتقل إلى نباتات الطماطم و *Gynura*. كلما تقدم المرض فإن الأعراض تتميز بالتقزم وتبدلي الورقة وتشوهها. أعراض الإصابة الفيروسية في الطماطم تفترض حدوث اضطرابات في عمليات تنظيم الأثيلين لنمو وتكشف الأوراق. لقد افترض بأن الأثيلين يدخل في كشف استجابة النبات العائل للفيروسات. لقد وجد أيضاً أن الإصابة بفيروس CEVd تحدث زيادة في إنتاج الأثيلين في نبات *G. aurantiaca* وكذلك يكون هناك زيادة إطلاق الأثيلين في نباتات الطماطم وهذا يتسبب عن زيادة الحث على إنتاج (1) aminocyclopropane - 1 - carboxylic acid ويرمز له ACC وحيث أن ACC وسيط في إنتاج الإثيلين كما في:



إن مركب SAM هو S - adenosylmethionine.

كذلك فإن ACC يمكن أن يمثل إلى شكل متحول غير طيار Non - Volatil يعرف في عديد من الأنسجة على أنه ACC - malonyl - N. إن أعراض الإصابة والتعبيرات التي تظهرها النباتات المصابة تبدأ من قمة الأوراق المتدلية في الأوراق القمية والتي لا تلبث أن تتجدد وتشوه بشدة كلما تدخلت الإصابة الفيروسية مع عملية الكشف الطبيعية. يمكن تلخيص تأثير الفيروس على إنتاج الأثيلين في الآتي:-

١ - إن التفاعل الجهازي لنباتات الطماطم ونباتات *Gynura* مع فيروس CEVd يكون متبوعاً بزيادة ليس فقط في إنتاج الأثيلين ومستويات ACC ولكن

أيضاً يكون متبوعاً بزيادة تجمع ال ACC المتحول كما يحدث فى بناء الاثيلين فى أوراق الدخان المصابة بفيرس موزايك الدخان، الذى يحدث تفاعل الحساسية الفائقة.

٢ - إن تشجيع بناء ال ACC يمكن أن يعتبر نتيجة للزيادة الثابتة فى إنتاج الاثيلين، هذا الثبات يكون فى المستوى المضطرب من ACC الحر ومن زيادة تجمع ACC المتحول.

٣ - إن زيادة تجمع ACC المتحول يؤدى إلى القول بأن هذا يكون أقل هجرة من الزيادة الكبيرة فى كمية ACC المنتجة بواسطة الإصابة الفيرويدية.

٤ - خلال الأعراض المبكرة يزداد بناء ال ACC ويبقى ثابتاً خلال تشكف الأعراض ولكن لا يكون هناك إختلافاً فى كفاءة الانقلاب فى ال ACC إلى أثيلين بين الأنسجة السليمة والمصابة بالفيرويد.

٥ - فى أوراق نباتات الطماطم المظهرة أعراض جهازية للإصابة بالفيرويد يكون هناك تشجيع على إنتاج مستويات عالية من ACC وتشجيع على إنتاج الاثيلين فى نسيج ورقة الطماطم.

٦ - الفيرويد CEVd يسبب زيادة فى إنتاج ACC فى أوراق الطماطم وبسبب تشوهات فى جدار الخلية وتغير فى تركيب هذا الجدار ويمكن أيضاً أن يحدث تغير فى الغشاء البلازمى وهذا يكون له دور فى إنتاج ACC حيث ذكر Anderson et al سنة ١٩٨٢ أن ال Cellulysin ويقايا الجدار المهضوم للخلية تستطيع أن تشجع زيادة إنتاج الاثيلين.

علاقة البولى أمين مع الإصابة بفيرويد CEVd وهل يمكن استعمال Putrescine فى مقاومة CEVd ؟؟

أجريت تجارب على مستويات البيوترسين Putrescine، سبيرميدين Spermidine والسبيرماين Spermine (وهى أكثر مركبات البولى أمين إنتشاراً فى أنسجة النبات)

فى أنسجة النبات المصابة بالفيرويد CEVd أو المعاملة بنترات الفضة أو مركب الايتافون (2-chloroethyl phosphonic acid) مقارنة مع النباتات غير المصابة. وكذلك درس تأثير مثبطات بناء الايثيلين أو فعله على مستويات البولى أمين وكذلك تأثير الإضافات الخارجية من البولى أمينز على مجموعة الأعراض المرضية المتسببة عن الفيرويد CEVd ونشاط ال Protease المحدث بواسطة المعاملة بأيونات الفضة فوجد ما يلى:-

١ - تسبب الإصابة الفيريودية زيادة فى إنتاج الايثيلين فى نباتات العائل وتشجع تجمع ما يسمى PR proteins (Pathogenesis related) وإن الزيادة فى إنتاج الايثيلين تفوق نقص محتويات ال Putrescine فى النباتات.

٢ - معاملة نباتات Gynura بمادة $AgNO_3$ أو الايتافون تنتج تأثيرات مشابهة لتلك الحديثة بواسطة الإصابة بالفيرويد CEVd متضمنة زيادة فى إنتاج الايثيلين. إن التأثيرات المشابهة لتأثيرات الفيرويد المتسببة عن أيونات الفضة تعزى لمقدرتها على إطلاق الايثيلين المصنع فى نباتات Gynura. إن زيادة إطلاق الايثيلين يقلل كمية ال Putrescine.

٣ - هناك تأثيرات مشابهة تنتج بواسطة الايتافون والمركبات المطلقة للايثيلين.

٤ - إن مجموعة الأعراض الشبيهة بأعراض الفيرويد والمتسببة عن نترات الفضة فى نباتات Gynura قد أوقفت بواسطة مثبطات بناء الايثيلين AVG (amino ethoxyvinyl glycine) ومثل amino oxy acetic acid أو Co^{2+} أو بواسطة مثبطات فعل الايثيلين Norbornadiene حيث تمنع استنزاف ال Putrescine بدون أن تؤثر على بناء الايثيلين، هذا يدل على أن العلاقة بين زيادة بناء الايثيلين ونقص البتروسين ليس بسبب المنافسة البنائية لمادة S-adenosylmethionine. وقد وجد أن الايثيلين والبولى أمين تشترك فى بناء ال S-adenosylmethionine يبدئ مشترك فى طريقة بناء الايثيلين والبولى أمين.

٥ - يحدث نقص في مستوى الـ Putrescine في أنسجة الورقة المصابة بالفيروس أو المعاملة بنترات الفضة أو الايتافول ولم يكن هناك تأثير معنوي على مستويات كل من Spermidine أو Spermine وهذا يؤدي إلى القول بدخول البولي أمين في تفاعل العائل مع الفيروس. إن هذا الخفض في محتوى الـ Putrescine هو خطوة إشارية في تحويل سلسلة تفاعل تؤدي إلى استجابة النبات للإصابة. هذا يمكن أن يستنتج مما وجد بأن تعويق النقص في مستوى الـ Putrescine خلال الإضافات الخارجية من بعض المركبات تمنع التعبيرات المنتجة بواسطة الفضة والتي تشبه أعراض الفيروس (مثل تشوه الورقة، تثبيط نمو الجذر، تجمع PR proteins وتشجيع تحليل البروتينات المرافقة مع استجابة النبات).

إن زيادة إنتاج الاثيلين تكون مسؤولة عن النقص في مستوى الـ Putrescine وهذا قد تأكد مع نتائج الأبحاث التي ذكرت بأن أنزيم Arginine decarboxylase، الأنزيم الرئيسي المسؤول عن بناء الـ Putrescine في النباتات قد تثبط بواسطة الاثيلين بتركيزات فسيولوجية.

٦ - إن تكشف الأعراض الشبيهة بأعراض الفيروس وإنتاج بروتينات متعلقة بالمرض والزيادة في نشاط الـ Protease المحدث بواسطة أيونات الفضة كلها أوقفت بواسطة الإضافة الخارجية من الـ Putrescine.

في النهاية نستطيع أن نجاب على هذا السؤال الذي هو عنوان هذه المقالة وهو هل يمكن استعمال الـ Putrescine في مقاومة الفيروس؟؟ نستطيع أن نقول نعم ولكن الأبحاث المستقبلية هي التي نتائجها ستوافق معنا أم لا.

إحداث بروتينات لها علاقة بالمرض بواسطة CEVd :

لقد وجد أن البولي بيتايد Polypeptide المرافقة للإصابة الفيروسية ليست متخصصة بالفيروس ولكنها تنتج من التغيرات التي يحدثها المرض في ميتابولزم العائل. هذه الحقيقة شجعت الباحثين على البحث عن بروتينات من الممكن أن يكون لها دور في الاستجابة المرضية.

لقد أمكن اكتشاف عشرة PR Protiens فى نباتات الطماطم المصابة بفيروس CEVd واحد منها ذو تأثير حامضى والتسعة الآخرين ذات تفاعل قاعدى. إن هذه البروتينات يمكن إنتاجها بواسطة (باستثناء رقم عشرة C 10) معاملة أوراق الطماطم بنبترات الفضة أو بمحلول الايتافون. وهى كذلك تنتج مترافقة مع أعراض التحلل الموضعى والأعراض الجهازية والإصابة الفيروسية. ولقد ثبت بأن تجمع هذه البروتينات لا علاقة له بتحلل الخلية النباتية أو موتها. كما وأن حقيقة أنه لا يوجد PR Protiens فى أنسجة الورقة الملاصقة لتلك المعاملة بالايثافون يدل على أنه لا البروتينات نفسها ولا أية أنواع كيميائية أخرى تشجع تكوين PR Protiens حيث أنها تهاجر من مكان الجرح إلى الأنسجة السليمة بكميات يمكن تقديرها. وبالتالي فإن تأثير الايتافون فى الطماطم موضعى جداً فى حين أنه فى الدخان يكون جهازى، لذلك فإن المعاملة بالايثافون تحدث أعراض شبيهة بأعراض الفيروس وتتشجع تراكم PR Protiens. هذا يؤدى إلى القول بأن الايثيلين داخل فى تكشف تفاعل النبات وتكوين PR - Proteins بعد الإصابة بالفيروس CEVd واستجابة للمعاملة بأيونات الفضة.

ولقد ثبت بأنه لا يوجد علاقة خاصة بين إنتاج PR Protiens وتفاعل الفيروس مع العائل، زيادة على ذلك فإن هذه البروتينات كلها تتكون فى النباتات التى وصلت طور الشيخوخة وأنها وسيطات فى إنتاج الايثيلين. بعض هذه البروتينات مقاوم للهضم بأنزيمات Trypsin و chymotrypsin - 8.

تأثيرات مضاد الفيروس Ribavirin :

بالرغم من الأهمية الاقتصادية والأضرار التى تحدثها الأمراض الفيروسية والتقدم الكبير فى علم الفيروسات إلا أنه لا يوجد طرق علاجية فعالة لمقاومة الإصابة الفيروسية لغاية ١٩٩٤ (حسب معرفة المؤلف). ظهرت بعض التقارير أهمها إثبات فقط تبحث المقاومة الكيميائية للأمراض الفيروسية. الأول بحث فى استعمال بعض المواد الكيميائية فى مقاومة مرض الدرنه المغزلية هذه المادة اسمها Piperonyl butoxide ويرمز لها $(C_{19}H_{30}O_5)$. وكذلك اقترح استعمال مادة putrescine فى

مقاومة فيروس اكسوكورتز الحمضيات. ولقد ذكر العالم Conejero سنة ١٩٨٢ طريقة في مقاومة مرض اكسوكورتز الحمضيات تعتمد على استعمال نترات الفضة والاثيلين ولكن لم يكتب لها النجاح لعدة إعتبارات.

أما التقرير الثانى عن المقاومة الكيماوية للفيروسات تكلم عن استعمال مادة الريبافارين Ribavirin واسمه الكامل (1, 2, 4 - triazol - ribofuranosyl - 3 - carboxamide) هذا المركب ذو تأثير واسع ضد الفيروسات وقد تبين أن له تأثيراً مثبطاً لتناسخ أعداد ال DNA فى النبات والحيوان وكذلك RNA الفيروسي سواء فى المعمل أو فى الطبيعة. ولقد أجريت دراسة لتحديد مدى قدرة هذه المادة فى حفظ أو التأثير على الإصابة بفيروس CEVd فى نباتات *G. aurantiaca*.

لقد وجد أن استعمال ال Ribavirin على النباتات المظهرة أعراض ابتداءً من يوم ٢٥ بعد الحقن أدى إلى خفض تدريجى فى شدة الأعراض فى كثير من الأوراق المتكونة حتى تلك المتكونة بحوالى ٣ أسابيع بعد ابتداء المعاملة، أظهرت قليل وأحياناً لم تظهر أعراض. جميع التركيزات المستعملة من ال Ribavirin بين ٣٠ - ١٤٠ ملغ / لتر كانت ذات فعالية متساوية على الفيروس. أما عند الرش بمادة Tween (كنترول) لم يظهر لها تأثير على تكشف أو نمو النبات (شكل ٥١).

إن الشفاء من المرض وقلة التأثيرات السامة عند المعاملة بال Ribavirin يعود ذلك إلى غياب مكونات بعض البروتينات التى عادة ما تكون مترافقة مع المرض مثل P₂ و P₁ وكذلك غياب أى تغيرات فى سلوك البروتين التى يمكن أن تعزى إلى شدة المرض وإجهاد النبات.

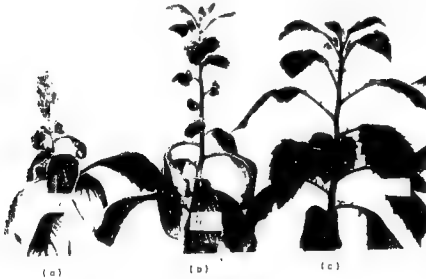
فى تجارب أخرى استعمل فيها ال Ribavirin على النباتات بثلاثة أيام قبل الحقن ففى هذه الحالة فإن هذه المادة أوقفت تكشف أو حدوث المرض وظهرت النباتات سليمة ولم يمكن استرجاع الفيروس ثانية ولم تثبت له أية حيوية. يمكن أن يفسر ذلك عن طريق عدم وجود زيادة فى ال P₂ و P₁ عديدة الببتايد.

أما المعاملة بتركيزات أقل من ٣٠ ملغ / لتر فإنها لم تكن فعالة، بينما

السمية Phytotoxicity وتقزم وتدلى الورقة تحدث مع المعاملات على تركيزات ١٦٠، ١٨٠ و ٢٠٠ ملغ / لتر.

يمكن تلخيص ما سبق بأن المعاملة بمادة Ribavirin تسبب خفض شديد في محتوى الفيرويد في أنسجة العائل. ونظراً لأن الحويّة والمرضية لجزيئات الفيرويد خارج النبات لم تتأثر بواسطة التعريض المباشر لمادة Ribavirin وبالتالي فإن التأثير يكون بسبب تأثير هذه المادة على عملية تناسخ الفيرويد.

مع أن الميكائزيم الدقيق لفعل مادة Ribavirin غير معروف بالضبط، إلا أنه يمكن القول بأن فعل هذه المادة يمنع بناء الحمض النووي الفيرويدي عن طريق تثبيط بناء نيوكلييتيدات الجوانين Guanine. ونظراً لأن CEVd غنياً نسبياً بهذه النيوكلييتيدات Guanosine فمن الممكن تخيل أن الـ Ribavirin يؤثر على تناسخ الفيرويد بأكثر شدة من تأثيره على إنتاج الحمض النووي في العائل. هذا يمكن تأكيده بالاعتماد على حقيقة أن المادة المذكورة تخفض بشدة مستويات الفيرويد بدون إحداث تأثيرات سامة.



شكل رقم ٥١ :

استعمال الـ Ribavirin في مقاومة فيرويد اكسوكورتر الحمضيات الذي يهاجم نباتات *G. aurantiaca*. a = نباتات مصابة غير معاملة، b = نباتات مصابة بالفيرويد ومعاملة بالرايبافارين. c = نباتات غير مصابة بالفيرويد ومعاملة بالرايبافارين. كان يستعمل الرايبافارين رشاً على الأوراق بنسبة ٥٠ ملغ / لتر ابتداءً من ظهور أعلى كثافة من الأعراض على النبات (٢٥ - ٣٠ يوم بعد الحقن) ويكرر الرش كل ٤ أيام لمدة ٢٠ يوم.

الوقاية بالتضاد في فيروس اكسوكورتز الحمضيات

١ - الوقاية بالتضاد بين سلالتين من فيروس CEVd :

في عمليات حصر أجريت لتعريف الصفات البيولوجية لعدد من عزلات فيروس CEVd أخذت من مصادر حقليّة، فتبين أن هناك عزلات تحدث تفاعل شديد من أعراض الاكسوكورتز في نبات السترون وهو الأترج Citron medica مأخوذة من الحمضيات. في حين أن هناك عزلة من الفيروس تحدث أعراض معتدلة على نبات G. aurantiaca وقد اكتشفت هذه العزلة في نبات السترون ووصفت بأنها سلالة معتدلة من الفيروس CEVd على نبات السترون وذلك اعتماداً على حجمها وتماثل قواعدها واعطيت اسم CEVd - 129.

أجرى اختبار الوقاية بالتضاد بين العزلة CEVd - 129 كمزلة واقية (حافظة) ضد السلالة المتحدية وهي السلالة الشديدة من CEVd على نباتات Gynura. وجد أن السلالة المعتدلة من الفيروس CEVd - 129 يمكن أن تكسب النبات وقاية مظهرية ضد السلالة المتحدية الشديدة. هذا التأثير الواقي يكون على درجات والتي يتراوح بين تأثير بسيط في إظهار الأعراض من قبل السلالة الشديدة إلى وقف تام لظهور هذه الأعراض. إن مستوى هذه الوقاية يعتمد على طول الفترة بين الحقن بالسلالة المعتدلة والسلالة الشديدة. في جميع الحالات فإن تأثير حفظ النبات بواسطة السلالة المعتدلة ضد السلالة الشديدة كان مؤقتاً وذلك نظراً لأن الأعراض وتركيز الفيروس يزداد بشكل كبير بالنسبة للسلالة الشديدة كلما قلت الفترة بين الحقنتين والذي يعكس سيطرة هذه السلالة عند إجراء حقن مختلط من السلالتين في وقت واحد، لذلك حتى تتم الاستفادة من هذه الظاهرة يجب إطالة الفترة بين الحقن بالسلالة المعتدلة والسلالة الشديدة، حتى يكون هناك فرصة كافية لتناسخ السلالة المعتدلة.

٢ - الوقاية بالتضاد بين فيروس CEVd وفيروس PSTVd :

هناك دراسة لمعرفة تأثير الوقاية بالتضاد بين فيروس اكسوكورتز الحمضيات CEVd وفيروس الدرنّة المغزلية في البطاطس PSTVd. أجريت عدة تجارب

على نبات *G. aurantiaca* ونباتات طماطم *L. esculentum* حيث حقن النباتين بسلالات شديدة من فيروس CEVd وسلالات شديدة أيضاً من فيروس PSTVd ثم لوحظت النباتات واكتشفت الفيروسات بطريقة PAGE فوجد أنه عندما تحقن نباتات *G. aurantiaca* بالفيروسين كل لوحده فإن هذه النباتات المحقونة يظهر عليها أعراض شديدة بواسطة CEVd وأعراض بسيطة بواسطة PSTVd وكذلك فإن CEVd يتجمع بمستوى أعلى منه في حالة PSTVd، بينما عندما حقنت نباتات الطماطم بالفيروسين كل على حدة فإن كل فيروس أعطى أعراض شديدة (إلا أن التفاعل كان أكثر شدة وكفاءة بواسطة PSTVd منه في حالة CEVd) وكذلك فإن مستوى تجمع PSTVd كان أعلى بكثير منه في حالة CEVd.

عند حقن نباتات *G. aurantiaca* بالفيروسين معاً فإن الأعراض التي تظهر تكون مميزة للفيروس CEVd وهو الفيروس الوحيد الذي يمكن اكتشافه في النبات. أما عند حقن نباتات الطماطم بالفيروسين معاً فإن الأعراض الملاحظة على نباتات الطماطم تأخذ الأعراض النموذجية للإصابة بالفيروس PSTVd وهو الفيروس الوحيد الذي يمكن إسترجاعه ثانية من النبات.

ومن ناحية أخرى عندما حقنت نباتات *G. aurantiaca* بفيروس PSTVd أولاً ثم حقنت بعد ذلك بفترة أسبوع بفيروس CEVd، فإن أعداداً من النباتات أظهرت أعراض مميزة للإصابة الشديدة بالفيروس CEVd وكلا الفيروسين كان موجوداً في المستخلص النباتي وهناك أعداداً أخرى من النباتات أظهرت أعراض السلالة المعتدلة للإصابة بفيروس PSTVd وهو الفيروس الوحيد الذي يمكن عزله منها. وعلى أية حال عندما قطعت قسم النباتات المحفوظة بالتضاد فإن الأفرع الجديدة أظهرت أعراض شديدة للإصابة بالفيروس CEVd فقط وهو الفيروس الوحيد الذي يمكن اكتشافه في النبات. هذا يدل على أن كل من PSTVd و CEVd يتنافسان على عوامل محددة في العائل تلزمهما في التناسخ والحركة والتجمع وإن CEVd له قدرة تنافس أعلى في *G. aurantiaca* من الفيروس PSTVd والعكس صحيح بالنسبة لنباتات الطماطم عند حقنها بالفيروس CEVd ثم بعد أسبوع تحقن بالفيروس PSTVd.

٢ - مرض ككسيا في الحمضيات

Citrus Cachexia Disease

مقدمة .:

كان أول ظهور لهذا المرض سنة ١٩٢٨ وكان أول وصف علمي له سنة ١٩٣٤ في فلسطين وذلك من قبل كل من Reichert و Perlberger على الليمون الحلو *Citrus limettlodes* وكان يطلق على المرض اسم Xyloporosis. يحدث هذا المرض بشكل أساسي على أصول الليمون الحلو وأشجار الشموطى للبرتقال الحلو. الأشجار المصابة تتدهور نوعاً ما وبالتدريج وتصبح غير منتجة خلال بضع سنين. قد يلاحظ أعراض بسيطة على بادرات الليمون الحلو. كذلك فإن المرض يصيب الماندرين Mandarin ولكن لا يصيب الليمون الحامض والكريب فروت. لوحظ المرض سنة ١٩٥٢ على أشجار *C. reticulata* المطعومة على *C. paradisi*.

يوجد مسبب المرض في جميع مناطق زراعة الحمضيات في العالم وهو أكثر أهمية في مناطق البحر الأبيض المتوسط وفي بعض مناطق البرازيل والأرجنتين حيث يزرع الليمون الحلو وهو الأصل القابل للإصابة بالمسبب. أجريت دراسات عديدة على هذا المرض في البرازيل والأرجنتين منذ سنة ١٩٥٧. ذكر وجود المرض في جنوب افريقيا سنة ١٩٥٨. أما في فلوريدا فكان أول ذكر له سنة ١٩٥٧.

المرض واسع الانتشار في أصناف الحمضيات مثل الليمون الحلو، الماندرين، ليمون الماندرين، التانجالو وليمون *C. macrophylla*. ولقد ذكر أن قليل من بعض

أنواع الليمون الحامض والتانجور وأنواع أخرى من الحمضيات يتكشف عليها أعراض المرض إذا أصيبت بالمسبب المرضي. ظل المرض خطيراً في كثير من بلدان حوض البحر الأبيض المتوسط حتى تم تغيير أصل الليمون الحلو واستعملت أنواع أخرى من الأصول. يكون تأثير المرض على أصول الليمون الحلو أقل على الأشجار النامية في الأراضي الخفيفة ولكن بعض الباحثين ذكر في إسرائيل أن لا علاقة للأصل النامية عليه الشجرة بشدة ظهور الأعراض.

مع أنه لا يوجد معلومات كثيرة عن الأهمية الاقتصادية لأضرار هذا المرض، إلا أنه بشكل عام يسبب تدهور كبير للشجرة وضعف عام وإن الحقل الذي يظهر فيه المرض يتلف بنسبة ١٠٠٪ بعد خمسة سنوات من الإنتشار.

الأعراض:

إن تفاعل الحمضيات مع مرض ككسيا يؤدي إلى ظهور مجموعة من الأعراض تتراوح من التنقر البسيط أو المعتدل في الخشب إلى مرحلة متقدمة من تقشر القلف واضطرابات في تكوين الخشب، وتشرب الأنسجة المصابة بالتصمغ. من الصعب التمييز بين أعراض هذا المرض وأعراض الإصابة ببعض الفيرويدات الأخرى وهذا يؤدي في كثير من الأحيان إلى أخطاء في التشخيص واختلاف في نتائج بعض الأبحاث. يجب عدم الاعتماد على تنقر الخشب لوحده كعلامة مشخصة للمرض، إلا أن كثير من الباحثين ذكروا بأن أولى الأعراض تظهر على شكل تنقرات في الوجه الخارجي للخشب مع وجود تنوعات متبادلة على الوجه الكامبيومي في القلف. يكون لون قاعدة النقرة وقمة التواء مائل للبني. هذه الأعراض تلاحظ على الأشجار من صنف الليمون الحلو بعد تطعيمها بالبرعم لمدة سنة. وفي المراحل المبكرة من الإصابة يمكن أن تظهر الأعراض على الأنسجة القريبة من إتحاد البرعم بالأصل. أخيراً تصبح الثقوب ملاحظة بوضوح وينخفض سطح القلف على شكل بقع أو شرائح، وكلما نمت الأشجار، كثيراً ما يظهر نمو غير منتظم (متفاوت) بين الطعم والأصل حيث تأخذ هذه المنطقة شكل

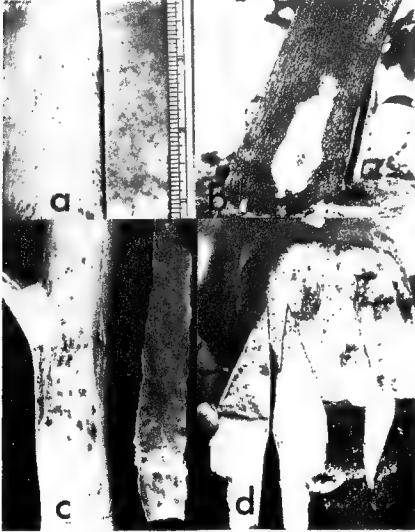
يشبه الركبة، وإن الخشب والقلف القريبان من الكامبيوم، يأخذان اللون البنى خاصة نقر الخشب والتتوعات المتبادلة في القلف. ولقد فسرت هذه الظاهرة على أن النقر في الخشب تكون كثيرة جداً وتقع قريبة جداً من بعضها البعض بحيث يبدو الخشب مثقبا على شكل غزال. في هذا الطور من المرض غالباً ما تصبح الأشجار مصفرة وذات أوراق صغيرة الحجم وتزهر الأشجار بشدة وتعطي محصول ثمار أكثر من الوضع الطبيعي.

يبدأ الطور الثالث من المرض بظهور تلون بنى على بعض المناطق في القلف، هذه الأجزاء الملونة تمتد بشكل عام إلى ما يقارب نصف الساق. تلون القلف يكون متبوعاً بالتشقق والأجزاء الملونة من القلف تصبح مائلة للون الأسود تشقق وتتشقق في قطع صغيرة. يجف الخشب بالقرب من هذه المناطق ويتحلل ويصبح أسود اللون، عندما يصل المرض إلى هذه المرحلة، أعداداً كثيرة من الأفرع تذوى تدريجياً ويبطئ حتى تصبح الشجرة كلها قد هلكت. إذا عمل مقطع عرضي في جذع شجرة ليمون حلو في هذه المرحلة الأخيرة من المرض يلاحظ بطشاً أو شرائح ملونة وأنسجة غير متعضية في الأجزاء الخارجية من الخشب شكل ٥٢. يلاحظ أحياناً ترسبات صمغية وتلون في اللحاء والذي يظهر قبل تشقق القلف أو نسلخه. يمكن ملاحظة بقع صمغية بعد إزالة قطع القلف بشكل خاص في أشجار Tangelos و Mandarins لا يلاحظ تلون في اللحاء ولا وجود تصمغات على أشجار الليمون الحلو ولذلك لا يلاحظ تلون اللحاء في أشجار Tangalos وهذا يعتمد على الصنف.

من بين ٤٥ صنف من الحمضيات حساسة للمرض فإن هناك نوعان فقط يتفاعلان مع المرض بدرجته المختلفة كما في شكل ٥٣. كما ذكر سابقاً فإن تنقر الخشب لا يستعمل لوحده كعامل مشخص للمرض ولكن تشرب الصمغ في القلف في بعض أنواع الحمضيات يمكن أن يتسبب عن الفيروس وفي حالات قليلة عن بعض الفيروسات.

انتقال المرض:

إن هذا المرض واسع الانتشار في معظم أنحاء العالم. يمكن أن ينتقل عن طريق التطعيم. يمكن أن ينتقل عن طريق البذور وعن طريق الحشرات القشرية.



شكل رقم ٥٢:

أعراض مرض ككسيا في الحمضيات

- A: تنقر بسيط في الخشب.
- b: بداية تقشر خارجي للقلف مظهر تجمع الصمغ.
- c: مراحل متقدمة من المرض.
- d: تأثير شديد في منطقة إتحاد الطعم مع الأصل.



شكل رقم ٥٣:

العلوي: الوجه الكاسيومي من جهة الخشب على الشمال والوجه الكاسيومي من جهة القلف في اليمين كلاهما مصاب بفيروس ككسيا.
السفلي: مقاطع عرضية وطولية لنبات التانجالو المصاب بفيروس ككسيا مظهر الأنسجة غير الطبيعية وترسبات الصمغ في الخشب.

سبب المرض :

يتسبب هذا المرض عن فيروس Citrus Cachexia Viroid واختصار (CCaVd) وقبل سنة ١٩٩٢ كان يكتب بدون إضافة حرف d. يتبع هذا الفيروس مجموعة فيروسات الحمضيات الثانية CVd - II b ويتكون من ٢٩٩ نيوكليوتيدة ويستعمل له نباتات الأقحوان، الخيار والأترج نباتات كاشفة. وقد تكلمنا عنه بالتفصيل في موضوع فيروسات الحمضيات.

تأثير درجات الحرارة على فيروس ككسيا :

لقد تبين من أبحاث كثيرة أن الحرارة تؤثر تأثيراً كبيراً على حدوث الإصابة الفيروسية، بالإضافة إلى الظروف المثلى لنمو الخلايا التي تحتوى الفيروس في المزرعة. إن تركيب الفيروس ليس مقاوم للتشبيط بالحرارة فقط ولكنه أيضاً بشكل عام يتحمل درجات الحرارة المرتفعة الملائمة لتناسخ الفيروس. هذه الصفات أصبحت تقريباً عوامل تشخيصية لإصابة النباتات بالفيروس.

إن ملاحظة تأثير الحرارة على تجمع الفيروس قد أجريت لمعظم الأجزاء فى أنواع النبات والتي تظهر استجابة مرضية للإصابة الفيروسية. نظراً لأن الأترج يبقى بدون إظهار أعراض خلال الإصابة بفيروس ككسيا بالمقارنة مع تجمع CEVd، الفيروس الذى يحدث أعراض تقزم شديدة كاستجابة فى الأترج. عند تنمية نباتات الأترج المحقونة بفيروس ككسيا والاكسوكورنز فى درجات حرارة من ٢٢ - ٢٨م ثم تنقل إلى حرارة ١٧ - ٢٩م (أقل درجة حرارة وأعلى درجة حرارة تنمو عليها الأشجار)، كان نمو الأترج غير المحقون معوقاً بنسبة ٥٠٪ تقريباً باستعمال نظام درجات الحرارة المنخفضة. كما وأن تحضيرات الحمض النووى من النباتات النامية تحت درجات حرارة منخفضة تظهر DNA Polydispersity فى الجيل أقل من تلك المأخوذة من النباتات النامية تحت درجات حرارة مرتفعة. كان هناك تركيزات أعلى من CEVd فى النباتات النامية تحت درجات حرارة عالية أكثر منه تحت درجات

الحرارة المنخفضة. هذا التفاعل يكون واضحاً بشكل خاص في الجيل المصبوغ بالايثيديوم برومايد. إن تركيزات فيروس ككسيا تحت كلا الظروف تبدو أساسياً متكافئة أو أكثر قليلاً في النباتات النامية تحت الظروف الباردة. هذه الاستجابة غير شائعة في كثير من الفيروسات.

المقاومة:

يمكن إتباع طرق المقاومة المذكورة مع مرض اكسوكورتز الحمضيات في الصفحات السابقة.

٢ - فيروسات نخيل جوز الهند

١ - مرض كادانج - كادانج في نخيل جوز الهند

Cadang - Cadang Disease of Coconut Palm

مقدمة :

كانت أول ملاحظة للمرض سنة ١٩٢٧ منذ الوقت الذى دمر فيه مرض كادانج - كادانج زراعات جوز الهند فى جزيرة San Miguel وفى Albay . إعتبر المرض أكثر الأخطار تهديداً لجميع مصانع جوز الهند فى الفلبين . بدأ إنتشار المرض بشكل وبائى سنة ١٩٣٠ ، ومن بين ٢٥٠ ألف شجرة نخيل جوز الهند ، بقيت عدة مئات فقط والباقي كله دمر تحت وطأة المرض . ظهرت أوبئة مشابهة فى مناطق أخرى من Bicol وبحلول عام ١٩٥٦ فإن نصف الأشجار المثمرة فى المنطقة كانت مصابة ، وبالإجمال يمكن القول بأن مرض كادانج كادانج قد قتل حوالى ٣٠ مليون نخلة جوز الهند خلال الأربعين سنة الأخيرة فى الفلبين .

كلما ازداد تهديد المرض للمزارعين كلما إرتبطت به أبحاث الباحثين والعلماء للبحث عن مسببه وعن طريقة لحفظ الأشجار السليمة . لغاية سنة ١٩٨٠ نشر عن هذا الموضوع ٢٣٤ بحثاً وذلك بواسطة ١٢٣ باحث . وقد ثبت بأن المرض غامض وصعب الاكتشاف كما أنه مدمر . وبالرغم من الآراء العديدة والنظريات التى ظهرت عن هذا المرض ، إلا أنه لم يظهر أى بحث مقنع يؤدى إلى توضيح سليم عن هذا المرض وذلك حتى منتصف السبعينات . وفى أواخر السبعينات ثبت بأن

مرض كادانج - كادانج هو مرض فيرويدي وتحدد مسببه وهذا أدى إلى حل مشكلة كبيرة نشأت مع نشوء المرض.

هناك مشاكل عديدة قابلت الباحثين في هذا المرض حيث استمرت الأبحاث من سنة ١٩٣٠ إلى سنة ١٩٧٦ وقد ذكر كثير من الباحثين أن هذا المرض غامض ومثير. بعد اكتشاف المسبب تبين أن المشاكل التي كانت تقابل الباحثين في هذا المرض هي :-

١ - طول الفترة اللازمة للحصول على بادات من أشجار جوز الهند.

٢ - البادات التي أقل من خمسة سنوات لا يظهر عليها أعراض المرض أبداً.

٣ - يصعب اكتشاف الإصابة في الأطوار الأولى.

٤ - تستمر أعراض المرض على الشجرة مدة من ١٠ - ١٥ سنة.

٥ - يبدأ إثمار الأشجار وهي ذات عمر من ٥ - ١٠ سنوات.

٦ - تستمر الشجرة تعطى إثمار لغاية ٦٠ سنة على الأقل.

أعراض مرض كادانج - كادانج :

يستطيع الشخص المدرب ذو الخبرة أن يعرف بأن الشجرة أصبحت مصابة بهذا المرض عندما تبدأ في حمل جزوات أصغر وأكثر استدارة (كروية) عن الوضع الطبيعي وذات خدوش أو تشققات شكل ٥٤. أما من النواحي الأخرى فإن الشجرة تظهر سليمة تماماً، وفي الحقيقة فإن عدد الجزوات المنتجة يمكن أن يكون أكثر قليلاً من الوضع العادي، ثم بعد ذلك فإن علامات المرض الأخرى لا تلبث أن تتداعى للظهور. يتكشف على الأوراق بقع صفراء والتي تظهر مائية في إنعكاس الضوء شكل ٥٥. وهي لا تشبه البقع المتكونة عن الحشرات الماصة ولا البقع الناتجة عن بعض الفطريات، وليس لها مركز بني، تصبح البقع أكثر عدداً كلما

تقدم المرض معطية ثلثي الجزء السفلي من قمة الشجرة المظهر المصفر بعد مدة من الزمن.

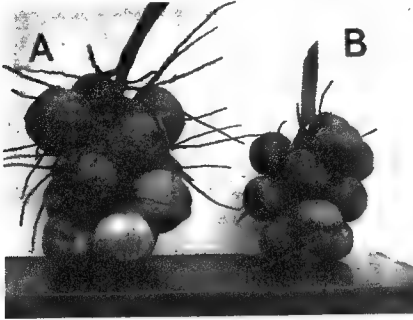
إنتاج الجوزات ينخفض ويتوقف بعد ٢ - ٣ سنوات من ظهور أول الأعراض. عناقيد الزهرة (المثاكيل أو الشماريخ) تصبح أصغر وذات قمم سوداء وغالباً ما تفشل في الخروج كاملة من الغطاء المغلف لها شكل ٥٦. تبقى الألياف عادة متلاصقة مع قواعد السعف، مع أنه في الأشجار السليمة يكون هذا الليف منفصلاً وبعيداً عن قواعد السعف. كلما تقدم المرض أكثر يصبح السعف أقصر شكل ٥٧. السعف الأكبر سناً فإنه يتدلى قبل أن يكتمل النمو والنضج ويسقط وتصبح قمة الشجرة صغيرة مقتصرة على باقة من السعف الأصفر القصير. لا تلبث أن تموت الأشجار بعد أن تصل هذا الطور. في كثير من الحالات تتقزم الأشجار بشكل واضح وتظهر الشجرة في حالة سيئة جداً من حيث قصر الأوراق وتدلبيها واصفرارها وعدم الإثمار وتموت الشجرة.

أما أعراض المرض الأكثر انتشاراً في منطقة جنوب غرب الباسفيك والتي تظهر على أشجار نخيل الزيت ونخيل جوز الهند، تكون الأعراض على شكل بقع برونزية على الأوراق والذي يسمى في الفلبين التبقع البرتقالي الوراثي (GOS) Genetic orange spotting.

الوقت الذي ينقضي بين ظهور أولى الأعراض وموت الشجرة يتراوح من ٣ - ١٥ سنة وبالمتوسط حوالي عشرة سنوات. يعتبر مرض كادانج - كادانج من أسهل الأمراض تشخيصاً وذلك بواسطة أعراضه الواضحة وبواسطة بطء تدهور الشجرة، وبالنسبة للمتخصصين بهذا المرض فإن أعراض المراحل المتقدمة للمرض لا تلبس أبداً مع الأمراض الأخرى أو الاضطرابات الفسيولوجية المختلفة مثل زيادة الرى أو نقص التغذية.

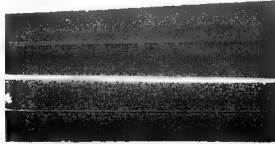
هناك صفة مميزة لهذا المرض وهي أن الأعراض تعتمد على عمر الشجرة.

النخلات (الأشجار) التي عمرها أقل من عشرة سنوات فإنها نادراً ما تصاب وتزداد نسبة الإصابة بالمرض كلما تقدم عمر النخلة حتى يصبح عمرها أربعين عاماً وعندها نسبة احتمال الإصابة تبقى ثابتة بعد هذا السن.



شكل رقم ٥٤ :

عناقيد من جوزات جوز الهند. A : سليمة. B : مصابة. لاحظ الإستدارة وصغر الحجم والخدوش في الثمار المصابة.



شكل رقم ٥٥ :

أعراض البقع المائية في الأوراق المصابة من نخيل جوز الهند بمرض كاداغ - كاداغ.



شكل رقم ٥٦ :

أعراض مرض كادانج - كادانج في النورة في أشجار نخيل جوز الهند. اليسار سليمة أما الوسط واليمين مصابة يلاحظ اسوداد القمة وعدم خروج عتاكيل الأزهار.



شكل رقم ٥٧ :

أعراض الإصابة بمرض كادانج - كادانج في نخيل جوز الهند يلاحظ اصفرار وتقدم وصفر قمة الشجرة المصابة مقارنة مع الشجرة السليمة على اليسار.

أصل وانتشار مرض كادانج - كادانج:

من أين أتى مرض كادانج - كادانج؟؟ هناك فرضيات تقول بأن المرض نشأ في جزيرة San Miguel في بداية الثلاثينات من هذا القرن ثم إنتشر إلى مناطق أخرى وبسرعة وتقدم في خلال العشرين سنة الأخيرة. وعلى كل حال فإن التقارير القديمة والدراسات الحديثة على إنتشار هذا المرض تعارض وتنكر هذه النظرية. إن أول نشرة عن مرض كادانج - كادانج يقول فيها كاتبها إنه في سنة ١٩٣١ زار منطقة الفلبين ولاحظ أن هذا المرض أكثر أهمية على أشجار جوز الهند في جزيرة San Miguel وكان المواطنون يسموه مرض كادانج - كادانج. هناك بعض الباحثين الذين ذكروا أن اسم هذا المرض كان مؤلفاً في أواخر الأربعينات وأوائل الخمسينات بالنسبة للمواطنين. هذه الآراء تبين أن المزارعين حاولوا مقاومة هذا المرض إلا أنهم لم يفلحوا في ذلك.

هناك أدلة أخرى ضد نظرية أصل نشوء المرض من جزيرة San Miguel وذكر أن المرض كان موجوداً في جميع مقاطعات Bicol وأنه لم ينتشر من جزيرة San Miguel.

الآثار الاقتصادية:

إن أكبر خسائر اقتصادية حدثت في أشجار جوز الهند نتيجة للإصابة بمرض كادانج - كادانج كان في الخمسينات حيث ذكرت الإحصائيات سنة ١٩٦٠ أن مليون شجرة ماتت خلال سنة واحدة في الفلبين أما الإحصاءات الحديثة سنة ١٩٨٢ تبين أن هناك حوالي ٥٠٠ ألف شجرة تفقد سنوياً من جميع مقاطعات الفلبين.

مصيب المرض:

منذ ملاحظة المرض سنة ١٩٢٧ بدأت الأبحاث لمعرفة مسبب المرض واستمرت حتى سنة ١٩٧٣ وعندما ذكر أن هذا المرض يتسبب عن فيروس وذلك اعتماداً

على طبيعة الأعراض ومقدرة المرض على أن ينتشر بشكل وبائي واستمرار المرض وتقدمه حتى بعد التسميد الجيد وعدم وجود بكتيريا أو فطر ممرض مرافق لهذا المرض. مع أن معظم الباحثين وافقوا على أن المرض يتسبب عن فيروس، إلا أنه لم يكن هناك دليل مقنع بأن هذا المرض معدى بالنسبة لأي من النباتات الأخرى. فشلت المحاولات التي أجريت لنقل مسبب المرض إلى أشجار أخرى سواء بالعصارة أو بالحشرات أو بأي طريقة أخرى.

مع كل هذه الحلقات من الفشل في الأبحاث إلا أنها لم تؤخذ كدليل على أن المرض لا يتسبب عن فيروس، حيث أن هناك بعض الفيروسات النباتية يصعب اكتشافها بالميكروسكوب الإلكتروني وكثير من الفيروسات النباتية يصعب نقلها عن طريق العصارة النباتية. كذلك استعملت أنواعاً عديدة من الحشرات لنقل المسبب من الأشجار المصابة إلى الأشجار السليمة واستعملت ملايين الحشرات وآلاف البادرات لنقل إليها المرض ولكن لم يثبت نهائياً أن مسبب المرض ينتقل بالحشرات.

بعض الباحثين مثل Petzold سنة ١٩٧٤ ذكر أن هناك كائنات شبيهة بالركتسيا في برانشيما اللحاء في الأشجار المريضة ولكن ثبت خطأ هذا البحث ثم إنجته البحث عن النيماتود وعن نقص العناصر في التربة ولكنها كلها فشلت في تحديد مسبب المرض.

في سنة ١٩٧٣ إنجته البحث عن الفيروس كمسبب لمرض كادانج - كادانج وبعد محاولات عديدة وإتباع طريقة PAGE تبين أن المرض يتسبب عن فيروس. كان أول تقرير عن وجود الفيروس كمسبب لهذا المرض سنة ١٩٧٥ وذلك من قبل العالم Randles.

أخيراً ثبت أن مرض كادانج - كادانج يتسبب عن فيروس سمي Coconut Cadanig - cadanig Viroid - ويكتب باختصار (CCCVd) أو ccRNAs.

جزيئات ccRNAs صغيرة جداً وذات صفات قريبة من صفات فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس. يتكون هذا الفيرويد من جزيئات RNA تكون دوائر مغلقة من RNA ذو خيط واحد وفيها مقاطع عديدة من القواعد المتكاملة والتي تشكل روابط هيدروجينية عبر الجزيء جاعلة الدوائر تنطوى وتعطى شكل ثنائى الخيط إلى حد ما. مثل هذا التركيب لا يوجد إلا فى الفيرويدات والفيروسايدات وغير معروف لأى جزيئات أخرى من RNA وهى تعطى الفيرويد صفات تكون متوسطة بين صفات RNA آحادى الخيط وثنائى الخيط. إن تسخين ccRNA تحت ظروف معينة Formamide يحطم الروابط الهيدروجينية عندئذ تفتح الدوائر ويمكن أن يلاحظ تحت الميكروسكوب الالكترونى. هذه المعاملة أظهرت أنه ليس جميع جزيئات ccRNA دائرية ولكن بعضها مستقيم وله طبيعة تركيب دبوس الشعر.

أشكال فيرويد CCCVd :

بالأبحاث المستمرة على فيرويد كادانج - كادانج فى أشجار جوز الهند تبين أن لهذا الفيرويد أربعة أشكال وهى:-

١ - 1 - CCCVd وهذا له نوعين سريع (f) وبطيء (s) ويكتب CCCVd-1-f أو CCCVd-1-s.

٢ - 2 - CCCVd وهذا له أيضاً نوعين سريع (f) وبطيء (s) ويكتب CCCVd-2-f أو CCCVd-2-s.

وفيما يلى شرح لاكتشاف وصفات هذه الأنواع.

بعد أن تم اكتشاف مسبب مرض كادانج - كادانج وتأكد أنه يتسبب عن فيرويد أو حمض نووى ccRNA تسابقت الأبحاث فى دراسة هذا المرض.

باستعمال طريقة التهجين الجزيئى والتي حساسيتها ١٠٠ ضعف حساسية طريقة الهجرة الكهربائية استعملت هذه الطريقة لدراسة ccRNA وتبين أن ccRNA

يتكون من 1 - ccRNA و 2 - ccRNA وإنهما متقاربين جداً من بعضهما البعض وهناك تشابه كبير جداً بينهما في تتابع القواعد. وفي الدراسات التالية أمكن معرفة التتابع الكامل لقواعد 1 - ccRNA و 2 - ccRNA وأصبح من الواضح أن 2 - ccRNA يمثل ببساطة ارتباط جزئيين من 1 - ccRNA فهي نمتلك (٥٠٠ نيوكليتيده للثاني و ٢٥٠ نيوكليتيده للأول، إلا أنه ثبت خطأ هذا التقدير) وكذلك تبين أن هناك علاقة قوية جداً بين ccRNA وفيرويد الدرة المغزلية في البطاطس حيث أن التركيب الثانوي لكل منهما متشابه جداً. وفي بعض المقاطع فإن تتابع القواعد في كليهما يكون متماثل وذلك في منطقة وسط الجزيء.

أظهرت الدراسات الأخرى أن كلا من 1 - ccRNA و 2 - ccRNA يمكن أن توجد بشكلين مختلفين سمي الأول سريع fast والثاني بطيء slow وذلك بسبب اختلاف سرعتهم في الهجرة الكهربائية في الجيل. إن الأشجار المصابة بالمرض في المراحل المبكرة جداً دائماً تحتوي الأشكال السريعة من 1 - ccRNA و 2 - ccRNA، بينما الأشجار المريضة في الأطوار المتأخرة من المرض دائماً تحتوي الأشكال البطيئة. أما الأشجار ذات الأعراض المتوسطة، دائماً تحتوي الشكلين مع بعض، ولكن في بعض الحالات النادرة يمكن أن تتواجد الأربعة أشكال مميزة في سعة واحدة (ورقة النخيل تسمى سعة). لقد ثبت أن السعفات الحديثة والتي لا تظهر أية علامات للمرض بأنها تحتوي الأشكال السريعة من 1 - ccRNA و 2 - ccRNA، بينما لم يكتشف أى من الأشكال السريعة في السعفات المتقدمة بالسن. كلما تقدمت السعة في السن كلما تحولت الأشكال السريعة إلى أشكال بطيئة من الفيرويد (جدول ٣١).

إن التمييز بين الأشكال السريعة والبطيئة من ccRNA مهم جداً وذلك لمعرفة إنتقال المرض.

جدول ٣١: وجود الشكل السريع والبطيء من ccRNA في سمقات نخيل جوز الهند المصاب بالمرض.

رقم السطة على الشجرة من القمة	شكل الفيريون في ظهور الأعراض	شكل الفيريون عند بداية الأعراض	شكل الفيريون في الطور الأول من المرض	شكل الفيريون في الطور المتوسط	شكل الفيريون في الطور المتأخر من المرض
١ - ١٢	سريع	سريع	سريع + بطيء	بطيء	بطيء
١٣ - ١٦	سريع	سريع	سريع	بطيء	بطيء
١٧ - ٢٢	-	سريع	سريع	سريع + بطيء	بطيء

انتقال مرض كادانج - كادانج والمدى العائلي للفيريون:

يمكن أن ينتقل المرض عن طريق حقن بادرات جوز الهند بالحقنة الضاغطة لمستخلص RNA من أوراق أشجار مصابة بالمرض. يكون النقل بهذه الطريقة بنسبة منخفضة حوالي ١٧٪ فقط. أجرى تحسين على هذه الطريقة حيث تحقق مستخلصات RNA المأخوذة من أوراق ذات إصابة حديثة وحيث أن هذه المستخلصات تحتوي الأشكال السريعة من ccRNA، وهذه الأشكال أكثر عدوى ونشاط في إصابة الأشجار من الأشكال البطيئة. عندما استعمل ٢ ملغ مستخلص غير مفصل من Unfractionated RNA يحوى شكل سريع كانت نسبة النجاح في الحقن ١٠٠٪ أما عندما كان يحوى الشكل البطيء كانت نسبة الإصابة ٣٠٪ أما عندما كان يستعمل ١,٧ ملغ فيه شكل سريع كانت نسبة النجاح ٣٠٪. أما استعمال ١,٣ ملغ يحوى شكل بطيء كانت نسبة الإصابة صفر٪.

تحقن البادرات بحقنة ضاغطة وذلك لإدخال محلول RNA في نسيج قمة البادرة حيث بدايات تكشف السمقات. يصعب إجراء الحقن إذا تعدت البادرة سن خمسة سنوات حيث أن قواعد السمقات تغطي على الأنسجة الطرية التي يتم فيها الحقن. بعد عملية الحقن تظهر الأعراض النموذجية بعد ١ - ٢ سنة من الحقن

وخلال مدة سنتين من الحقن يبدأ ظهور أعراض التقزم. عادة ما يتوقف إنتاج الجوزات كلية (لأن الشجرة حققت قبل الإثمار) ولكن في بعض الأصناف التي تعطى ثمار ميكراً فإن هذه الثمار يظهر عليها أعراض المرض النموذجية. بعد تقدم المرض وظهور المراحل الأخيرة يظهر سعفات قصيرة نموذجية الأعراض وتبقى الألياف ملتصقة مع قواعد السعفات. يكون تقدم المرض بطيء جداً في الحقن الصناعي أكثر منه في الحالة الطبيعية.

إن إنتقال المرض في الطبيعة عن طريق الحشرات الناقلة يبدو أنه أكثر عوامل النقل احتمالاً، مع أن جميع المحاولات التي بذلت لنقل الفيرويد عن طريق الحشرات القارضة أو الماصة فشلت في ذلك. ولقد وجد أن تجمع حشرة *Plesiopeis reichei* يكون بالقرب من الأشجار المريضة ١٦ ضعف وجودها بالقرب من الأشجار السليمة، وكذلك فإن حشرة *Octodonta angulosa* توجد بالقرب من الأشجار المريضة ٨٢ ضعف وجودها بالقرب من الأشجار السليمة، مع ذلك فإنه لغاية سنة ١٩٩٤ لم تحدد أية حشرة تنقل الفيرويد أو إذا كانت الحشرات ذات دور في نقل الفيرويد.

المدى العائلي:

يمكن أن يهاجم الفيرويد عدة أنواع من وحيدات الفلقة منها: -

1 - *Areca catechu*

4 - *Elaeis guineensis*

2 - *Corypha elata*

5 - *Chrysalidocarpus lutescens*

3 - *Adonidia merrillii*

6 - *Oreodoxa regia*

صفات فيرويدات كادانج - كادانج:

إن الشكليين من CCCVd التي ترافق مرض كادانج - كادانج تتواجد على شكل سريع fast يرمز له f وبطيء slow ويرمز له s. إن اكتشاف هذين النوعين لا يتأثر

بتخزين الورقة أو بطريقة إستخلاص الحمض النووي. إن الفحص الجهازي للأشجار المصابة أظهر أن حدوث هذه الأشكال يتأثر بطور تكشف المرض في الأشجار. إن الأشكال السريعة من كل 1 - ccRNA و 2 - ccRNA تكون سائدة في الأطوار الأولى من المرض، بينما الشكل البطيء هو الوحيد الموجود في الأطوار المتأخرة من المرض. في بعض الأشجار يحدث تحول من الشكل السريع إلى الشكل البطيء في السعفات التي حدث فيها تقدم كبير للمرض. إن كل من 1 - ccRNA السريع والبطيء كلاهما دائري وتختلف في الوزن الجزيئي وفيهما تشابه كبير في تتابع النيوكليوتيدات. إن اللقاح الذي يحوى الشكل السريع أكثر حيوية من الذى يحوى الشكل البطيء. يقدر الوزن الجزيئي بواسطة الميكروسكوب الالكترونى بحوالى ١٠٠ ٠٠٠ دالتون للسريع و ١٥٠ ٠٠٠ دالتون للبطيء. كما وأن 1 - ccRNA يوجد بكمية أكبر من 2 - ccRNA.

إن مرض كادانج - كادانج يختلف عن بقية الأمراض الفيروسية في نقطتين أساسيتين، الأولى: وجود نوعين من RNA مرافقة للمرض، الثانية التنوع المختلف في هذين النوعين ويسمى electrophoretic variation. إن الاختلاف الكبير في الحركة الكهربائية فى الجيل والوزن الجزيئى فى كل من 1 - ccRNA السريع والبطيء يعود لطول الوقت الذى خضعت فيه الشجرة للإصابة.

عند تخزين الورقة على ٤°م على فترات لمدة ٩ أيام أو التجميد على فترات لمدة ٤ أيام قبل الاستخلاص بالطرق القياسية ليس له تأثير على الشكل فى 1 - ccRNA. إن الهجرة الكهربائية سواء فى ٨ أو f على درجة الحرارة العادية أو ٦٠°م فإن كل منهما يسير فى الحزمة الخاصة به وهذه تميز الأشكال الدائرية من 1 - ccRNA.

إن الشكل 1 - ccRNA نوع f له محيط ١٠٧ نانومتر أما نوع (s) فإن له محيط ١٢٣ نانومتر وبالتالي فإن إختلاف التنوع فى الهجرة الكهربائية لا يعود للتركيب الثانوى أو لوجودهما على شكل دائرى أو مستقيم ولكن يرجع إلى إختلاف الوزن الجزيئى. فى جدول ٣٢ عزلت من 1 - ccRNA و 2 - ccRNA وبعض صفاتها.

عدد النيوكليوتيدات + طول القناع المتناظر في كل حزمة إن وبيد								
نوع الفيروس والمزلة	San Nicolas	Ligno 5	Ligno 1 T	Ligno 191D	Ligno 620 C	Ligno 140	Timmebac	Bono 54
ccRNA - 1 - fast	—	—	٢٤٧ / ٢٤٦	٢٤٧ / ٢٤٦	٢٤٧ / ٢٤٦	٢٤٧ / ٢٤٦	٢٤٦	٢٤٦
ccRNA - 1 - slow	(٥٠) ٢٩٧	(٥٠) ٢٩٦	(٥٥) ٣٠١	(٥٠) ٢٩٦	(٥٠) ٢٩٦	(٥٠) ٢٩٦	—	(٤١) ٢٨٧
ccRNA - 2 - fast	—	—	٤٩٤ - ٤٩٢	—	—	—	—	٤٩٢
ccRNA - 2 - slow	—	—	—	—	—	—	—	٥٧٤ (٤١)

ملاحظات: -

الرمز بين قوسين هو عدد النيوكليوتيدات الإضافية على الطول الأصلي (الطبع المتناظر).

الرموز اللاتينية (1) بين قوسين كلها على حد سواء كل منها لها عدد نيوكليوتيدات أعلى أو أقل.

(-) تدل على توجد حزمة نيوكليوتيدات لها الفيروس.

إن عزل Bono 54 هو النمط لفيروس كفاف - كفاف في الأداة لتشكل ولكن هي الفيروس عندما يذكر فيروس CCVd ولها ذكر اسم الفيروس مصدره هناك أنه

رقم ٢٤٦.

إن الأشكال السريعة والبطيئة من ccRNA - 1 (٢٤٦ و ٢٨٧ نيوكليوتيدة) والشكل السريع ccRNA - 2 (٢٩٢ نيوكليوتيدة) كلها معدية. لم يكن هناك فرق معنوي بين حيوية الأشكال السريعة من ccRNA - 1 و ccRNA - 2 وبين الأشكال المستقيمة والدائرية من ccRNA - 1. إن الشكل السريع من ccRNA - 1 هو بشكل معنوي أكثر الأشكال مقدرة على إحداث العدوى. إن القطعة الزائدة المكررة ٤١ نيوكليوتيدة خفضت حيوية وكفاءة الإصابة في ccRNA من ٦٨٪ إلى أقل من ٥٪. وبالتالي يمكن القول بأن جانب اليد اليمنى من الجزيء الأصلي للفيروس تلعب دوراً معنوياً في الحيوية. يوجد الشكل البطيء في الأشجار المصابة فقط في وقت ظهور الأعراض على الورقة. أما في المراحل المبكرة من المرض فإن الشكل السريع فقط هو الذي يكون موجود، وبالتالي فإن هذا الشكل هو المسؤول في الطبيعة عن انتشار المرض، وبالتالي فإن الأشكال البطيئة يكون لها دور أولي في كشف الأعراض، بينما الشكل السريع ccRNA - 1 - f يكون له الدور الأساسي

فى الحيوية وانتشار المرض. إذن يمكن القول بأن الشكل السريع 1 - f - ccRNA هو الوحدة الأساسية المعدية لفيروس كادانج - كادانج ويعتبر هو المثل الوحيد لفيروس كادانج - كادانج فى نخيل جوز الهند.

إن العزلة 54 Baao هى المثلة للفيروس 1 - fast - ccRNA وكذلك لـ ccRNA 1 - s - وإن الشكلين لـ 1 - ccRNA فىهما كثير من القواعد المزدوجة داخل الجزيء وتستطيع أن تشكل شكل شبه عصوى مثل بقية الفيروسات.

إن 1 - fast - ccRNA فيه ٢٤٦ نيوكليتيده أما الشكل البطيء فيه ٢٨٧ نيوكليتيده. إن الشكل البطيء 1 - s - ccRNA يحوى جميع التابع وتركيب أصغر الأشكال 1 - fast - ccRNA ولكن يختلف عنه بإضافة تتابع مزدوج وتركيب ٤١ نيوكليتيده من رقم ١٠٣ إلى ١٤٣ وهذه القطعة مضافة على نهاية اليد اليمنى من الجزيء الطبيعى للفيروس أما التابع المزدوج فهو على موقع ١٢٣ و ١٢٤ من 1 - f - ccRNA.

أما التابع النيوكليتيديات فى 2 - fast - ccRNA فهو يحوى ٤٩٢ نيوكليتيده أما الشكل البطيء يحوى ٥٧٤ نيوكليتيده وهما perfect dimers لأشكال 1 - ccRNA السريع والبطيء. إن كلا من 1 - f - ccRNA و 1 - s - ccRNA تحتوى على مواقع للانشطار بواسطة أنزيم Ribonuclease T₁ على اليد اليمنى مشكلة عروة دبوس الشعر بين المواقع ١٢٤ و ١٢٥ فى 1 - f - ccRNA وبين المواقع ١٤٥ - ١٤٦ فى 1 - s - ccRNA. كما وأن 2 - ccRNA به مواقع للانشطار، عند حدوث هذا الانشطار يعطى جزيئين من 1 - ccRNA.

تنوعات ccRNA البطيء ووقت حدوث الإصابة:

فى المراحل الأولى من مرض كادانج - كادانج فإن الأشكال السريعة فقط من 1 - ccRNA و 2 - ccRNA تكون موجودة فى الأشجار المصابة وبعد حوالى ٢٤ - ٣٠ شهراً من ظهور الإصابة، فإن الأشكال البطيئة من 1 - ccRNA و 2 - ccRNA تبدأ فى الظهور وتزداد بتقدم المرض حتى تختفى الأشكال السريعة

وتسود الأشكال البطيئة. هذه البيانات مع ما سبق من إثبات أن الأشكال السريعة أكثر عدوى وحيوية من الأشكال البطيئة تتفق مع الانتاج الجديد من فيروسات كادانج - كادانج. ويمكن تلخيص ما سبق فى النقاط الآتية :-

١ - الشكل البطيء من 1 - ccRNA يختلف عن الشكل السريع بوجود تنابع مفرد مكرر مفروز فى الجزئ ويمكن أن يتولد ببساطة من الشكل السريع بواسطة ميكائزم التجهيز أو النسخ.

٢ - عزلات الشكل البطيء من 1 - ccRNA تختلف فى الحجم وفى التتابع المتكرر المفروز وهذا يؤدى إلى القول بانعزال الأصل فى هذه التنوعات البطيئة.

٣ - بينما معظم العزلات السريعة تحتوى تنابع مختلف على نهاية 198 ويتكون من معدلات مختلفة من النوع 246 و 247 فإن كلا من العزلات التسعة البطيئة تحتوى بتجمع مفرد متجانس إما مع أو بدون نهاية C فى موقع متجانس لنهاية 198 فى الشكل f - 1 - ccRNA ومع حجم واحد من تنابع متكرر.

إن هذه المعلومات تتفق مع توليد ccRNA ذو الأشكال البطيئة من ccRNA الأشكال السريعة عن طريق تنابع مفرد نادر يحدث مرتين فى فيروس كادانج - كادانج، وبالتالي فإن جميع جزيئات ccRNA البطيئة نشأت من جزيئات آباء مفردة سريعة وتكون تجتمعت فى شكل معين.

طرق عزل ودراسة فيروس كادانج - كادانج

نظراً للطبيعة المختلفة لهذا الفيروس واختلافه عن بقية الفيروسات فضلنا أن نذكر الطريقة العملية لدراسته.

مصدر المادة المعدية :

تستعمل أشجار جوز الهند المصابة طبيعياً بفيروس كادانج - كادانج كمصدر للعدوى. تؤخذ سعفه رقم 6 (ذات عمر 5 - 6 شهور) أو سعفه رقم 20 (ذات

عمر ١٨ - ٢٠ شهر) حيث أنها تحتوي على أكبر تركيز من ccRNA، السعفة رقم ٦ تكون غنية بالفيرويد الشكل السريع والسعفة رقم ٢٠ تكون غنية بالفيرويد الشكل البطيء. يؤخذ حوالي ١ كغم من الوريقات من كل سعفة. تنزع الوريقات عن الحامل ويزال العرق الوسطى منها ثم تفرم الوريقات إلى قطع مساحة كل منها ١ سم^٢ ويستعمل سكين حاد.

استخلاص الأحماض النووية:

تستخلص الأحماض النووية من الأوراق وذلك بأن يؤخذ ٢٥٠ غرام من الأوراق المفرومة ثم تضرب في خلاط مع ٧٥٠ مللتر من محلول غير منتظم من ٠,١ مول سلفايت الصوديوم. يرشح المخلوط وينقى بواسطة آلة الطرد عن المركز سرعة ١٠٠٠٠ لفة لمدة عشرة دقائق. المواد الطافية من ٥ كغم أوراق تجمع ويضاف إليها Polyethylene glycol 6000 وذلك لترسيب الجزيئات الكبيرة Macromolecules. تجمع الكريات الصغيرة بواسطة آلة الطرد عن المركز وتستخلص مرتين بمادة SDS - phenol chlorophorm. ترسب الأحماض النووية من الطور المائي بإضافة ثلاثة أحجام من الإيثانول. تجمع الكريات الصغيرة الناتجة بواسطة آلة الطرد عن المركز ويعاد استخلاصها بمادة SDS - phenol chlorophorm. تجمع الأحماض النووية من الطور الثاني عن طريق الترسيب بالإيثانول. بعد ذلك يعاد تعليق الأحماض النووية في ٠,١ مول أستيت الصوديوم ونصف حجم من ١٪ Cetyl trimethyl ammonium bromide يضاف لإعادة ترسيب الأحماض النووية. تجمع الكريات الصغيرة بالطرد عن المركز وتغسل أربعة مرات في ٧٥٪ إيثانول محتوى ٠,١ مول أستيت الصوديوم. ثم بعد ذلك يعاد تعليق الكريات الصغيرة في ٠,١ مول أستيت الصوديوم وتستبعد الأحماض النووية أحادية الخيط بالمعاملة بمادة كلوريد الليثيوم. الباقي من الأحماض النووية (تشمّل RNAs الفيريدي) يعاد ترسيبها عن طريق إضافة ثلاثة أحجام من الإيثانول. الكريات

الأخيرة من الحمض النووي يعاد تعليقها في ٠,٠١ أستيت صوديوم، ٥٪ سكروز وذلك للهجرة الكهربائية.

فصل الأحماض النووية:

تفصل ccRNAs عن الأحماض النووية في النبات بواسطة ثلاثة دورات من PAGE وهى الاسم المختصر لـ Poly acry lamide gel electrophoresis باستعمال الجيل المائل. فى الدورة الأولى تهاجر جميع مستخلصات الحمض النووى من الأوراق تحت ظروف غير ملنثرة فى سمك ٣ ملم من ٥٠٪ جيل فى منظم TBE (Trie - borate). بعد الصبغ بمادة Toluidine blue و gel slices تحتوي ال RNAs المطلوبة. تقطع كل شريحة وتفرد على سمك ٣ ملم من ٥٪ جيل محبواً ٨ مول يوريا فى منظم TBE. تهاجر حزمة RNA فى الجيل الأصلى أثناء الهجرة الكهربائية. بعد الهجرة الكهربائية، فإن الأشكال المستقيمة والدائرية تتحدد بالصبغ وتفحص شرائح الجيل المحتوية على هذه الأشكال. كل شريحة تفرد على سمك ٣ ملم ٣,٣٪ جيل فى منظم TBE. وبعد الهجرة الكهربائية فإن حزمة RNA تكتشف بالغسيل أو الإزالة من قاعدة الجيل باستعمال جهاز الفصل Bio - Rad preparative apparatus. يجمع ال RNA بالترسيب مع ثلاثة حجوم من الايثانول محبوة ٠,١ مول اسيتات الصوديوم.

حقن بادرات جوز الهند:

يستعمل جوز الهند *Cocos nucifera* L. Tambolilid. تجمع الجوزات التى تستعمل كتنقاوى من ١٠٠ شجرة عشوائياً، هذه الأشجار يجب أن تكون ذات عمر ٢٥- ٣٠ سنة مفتوحة التلقيح. نفس الأشجار التى تؤخذ منها الجوزات تستعمل فى جميع التجارب اللاحقة. تحقن البادرات التى حصل عليها من الجوزات بمحقن ذو ضغط عال يسمى Panjet (معروف عالمياً خاصة فى لندن). التجربة الأولى تحقن البادرات ذات عمر ٣ شهور ثم تحفظ فى الظلام (شكل ٥٨) لمدة ٢٤ ساعة قبل الحقن بأربعة حقنات أخرى كل منها

١٠٠ ميكولتر فى قاعدة الانطلاقة الورقية الأولى ثم بعد ذلك تحفظ البادرات تحت الظل لمدة ٢ - ٣ أسابيع قبل نقلها إلى الحقل وتزرع على مسافات ٢ م.

أما فى الطريقة الثانية (التجربة الثانية) فإن الجوزات التى تستعمل تقاوى تزال قشرتها جزئياً وحال بدء ظهور الريشة من القشرة وكذلك الجذور تحقن البادرات بالحقن ويدخل ٢٥ ميكولتر لكل نمو. يستعمل أربعة جرعات تحقن فى قاعدة الريشة وأربعة جرعات للجذور. تحفظ البادرات المحقونة فى رمل رطب وفى الظل لمدة ٣ - ٤ أسابيع ثم تنقل وتزرع فى التربة فى أوعية بولى إثيلين ويحفظ فى الصوبا لمدة ٢ - ٣ شهور ثم تنقل إلى الأرض الدائمة.

إختبار البادرات المحقونة:

تجرى إختبارات التحليل للبادرات المحقونة لمعرفة وجود ccRNA المطلوب معرفته بعد ١ - ٢ سنة من الحقن وذلك بأخذ ١٠ غرام عينات من سعفات ذات عمر ٣ شهور ويجرى عليها عملية استخلاص الأحماض النووية وتقارن مع الإصابة الطبيعية. جدول ٣٣، ٣٤، ٣٥.

جدول ٣٣: يبين الإنتاج المتوسط لفيرويد كادانج - كادانج النقى فى جوز الهند المتحصل عليه من الإصابة الطبيعية فى النباتات.

إنتاج ccRNA ميكوغرام / كيلو غرام أوراق		شكل RNA	نوع ccRNA
متوسط	مدى		
٦٨	٢٣ - ١٥٤	دائرى	ccRNA - 1 - fast
٥	—	مستقيم	246 - 247 residues
			246 - 247 residues
			ccRNA - 1 - slow
٧٧	٢٥ - ٢٨٠	دائرى	287 residues
٨	٣ - ١٣	مستقيم	301 residues
٨	١ - ٢٥	دائرى	ccRNA - 2 - fast
			492 - 494
			ccRNA - 2 - slow
٤	١ - ٥	مستقيم	574

الأمراض الفيروسية للتسبية عن مجموعة PSTVd

جدول ٣٤ : حيوية الشكل السريع والبطيء للفيروس كادانج - كادانج المتقى من أشجار مختلفة.

النسبة المئوية للمبادرات المصابة بالحقن		تركيز الشكل I ميكوجرام / ملتر
شكل ١ بطيء	شكل ١ سريع	
صفر	٥٠	١٠٠
صفر	١٠	٦٤
صفر	١٠	٢٥
صفر	٣٠	١٠
صفر	٣٠	٥
صفر	١٠	٠.١

حقن عشرة بادرات كل مرة.



شكل رقم ٥٨ :

طريقة حقن بادرات جز الهند بالحقنة Panjet الشكل العلوي A بادرات ذات عمر ٣ شهور.
الشكل السفلي B بادرات حديثة الإنبات.

جدول ٣٥: مقارنة بين طريقتي الحقن (المذكورة في طريقة العمل) الأولى والثانية في البادرات ذات عمر ٣ شهور.

طريقة الحقن		شكل ccRNA المستعمل في الحقن
الثانية	الأولى	
٥/٣٤	٢/٥٠	ccRNA - 1 - f
٣/٣٥	١/٤٧	ccRNA - 2 - f
٤/٢١	٠/٥٠	ccRNA - 1 - s
١٢/٢٣	٢/٣٨	ccRNA - 1 - s + f

ملاحظة:

الرقم يدل على عدد النباتات المصابة على عدد النباتات المحقونة.

ب - مرض تنانجاجا في جوز الهند

Coconut Tinangaja Disease

كان أول ذكر لمرض تنانجاجا على أشجار نخيل جوز الهند *Cocos nucifera* سنة ١٩٧١ في جزيرة Guam من جزر ماريانز في المحيط الباسيفيكي. إقترح بعض العلماء أن مسبب هذا المرض مشترك مع مسبب مرض كادانج - كادانج على أشجار نخيل جوز الهند في الفلبين حيث أن كلا المرضين يؤدي إلى تثبيط نمو وموت العائل قبل تمام النضج، ولكن مرض كادانج - كادانج قد نال قدراً كبيراً من الدراسة. الصفات المشتركة الأخرى لهذين المرضين تشمل بقع شاحبة على الأوراق، خفض كبير في قمة الشجرة وانحطاط في حيويتها، وتأثير مدة البقاء للأشجار المصابة وتصبح ٢٥ سنة أو أكثر قليلاً (الوضع الطبيعي للأشجار تعيش ٦٠ سنة على الأقل). الاختلاف الوحيد الملاحظ في الأعراض هو التأثير على إنتاج الجوزات، حيث أن مرض كادانج - كادانج يرافقه دائماً إنتاج جوزات أصغر أكثر استدارة (كروية) وتكون ذات خدوش أو تشققات أما مرض تنانجاجا إذا تقدم

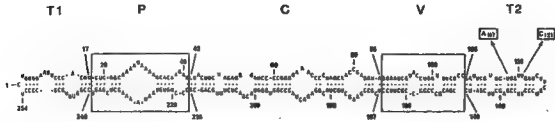
فى الأشجار فإنه يؤدى إلى ظهور جوزات صغيرة ذات قشور متطاولة محنطة بدون وجود نواة فيها.

وبالمثل كما فى مرض كادانج - كادانج فإن هذا المرض يتسبب عن فيروس.

مسبب المرض:

يتسبب المرض عن فيروس ويسمى فيروس تنانجاجا Coconut Tinangaja Viroid ويكتب (CTiVd). لقد اكتشف الفيروس فى تخضيرات الحمض النووى المأخوذة من أشجار نخيل جوز الهند المصابة بمرض تنانجاجا. مكونات RNA للفيروس تشبه تلك الموجودة فى مرض كادانج - كادانج فى جوز الهند الذى يتسبب عن فيروس CCCVd ولقد ذكر أن للفيروس الجديد نفس صفة الهجرة فى الجيل تشابه تلك التى لأصفر شكل من أشكال CCCVd ذو أل ٢٤٦ نيوكليوتيدة. زيادة على ذلك فإن تخضيرات الحمض النووى من الأشجار المصابة بالمرض تتجهن بكفاءة عالية مع cDNA (3H) المجهز للفيروس CCCVd ذو أل ٢٤٦ نيوكليوتيدة أكثر منه للحمض RNA للفيروس CCCVd نفسه وبذلك اقترح بعض العلماء التسمية المشتركة لمسببى المرضين. إلا أن اختلاف الأعراض فى الجوزات أدى إلى جعل العلماء يتفقوا على أن هذا المرض يتسبب عن فيروس غير فيروس CCCVd الذى يصيب أشجار جوز الهند فى الفلبين.

إن أنواع RNA ذات الهجرة المتشابهة فى الجيل مع CCCVd - 246 نقيت من مستخلصات الحمض النووى وجهزت من أشجار جوز هند مصابة بمرض تنانجاجا ودرس النتائج بها بطريقة Direct RNA enzymic. فوجد أن ال RNA المنقى به ٢٥٤ نيوكليوتيدة وأن هذا ال RNA مرافق دائماً لمرض تنانجاجا. أما التركيب الثانوى لهذا الحمض فهو مطابق لشكل التركيب الحلزونى والعصوى الشكل لفيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس. وجد أن لفيروس CTiVd سلالتين مختلفتين فى ٢ نيوكليوتيدة وقد لوحظت هاتين السلالتين فى العزلات المختلفة من الأشجار. وهناك مقارنة بين هذا الفيروس وفيروسات أخرى فى جدول رقم ٣٦. وإن الشكل الوصفى لهذا الفيروس مذكور فى شكل ٥٩.



شكل رقم ٥٩ :

تتابع النيوكليوتيدات المفترض في التركيب الثانوي لمزلقين من فيروس CTIVd، الاختلاف الوحيد بينهما هو وجود U محل A في الموقع ١١٧، ووجود U محل C في الموقع ١٢١.

إن فيروس CTIVd متقارب جداً مع فيروس CCCVd - 246 حيث أن فيهما نسبة تتابع متماثل تقارب ٦٤٪. إن التماثل الكبير وليس التماثل الكامل بين CTIVd و CCCVd يمكن أن يفسر إمكانية حدوث cross - hybridization بين كلا ال RNAs وكذلك الاختلاف في تعبيرات الأعراض بين الممرضين.

جدول ٣٦: تماثل التتابع بين نطاقات فيروس CTIVd وبعض الفيروسات المماثلة.

% تماثل تتابع في نطاقات						مقارنة CTIVd مع الفيروسات المذكورة
الكلبي	T ₂	V	C	P	T ₁	
٦٤	٥٩	٧٥	٦٦	٥٠	٦٨	CCCVd - 246
٤٣	٣٦	٢٨	٦٣	٣٦	٢٨	PSTVd
٤٠	٤١	٣٢	٤٧	٣٩	٦٠	HSVd
٤٦	٣٨	٤٠	٦٧	٣٨	٣٨	CEVd

بجانب التماثل بين CCCVd و CTiVd فإن هذا الأخير يحتوى عدة مناطق ذات تنابع وتركيب متماثل مع PSTVd ومتطابق مع نموذج النطاقيات المفترضة للفيروسات. وجد أن نطاق T₁ يحتوى تنابع متكرر من CCUC وهذه المجموعة تتكرر ابتداءً من ١ - ٢٥١. أما نطاق T₂ فإنه يحتوى تكرار CCUUC فى نيوكليوتيدات من ١٣١ إلى ١٣٥. أما نطاق P فى فيروس CTiVd فهو غنى بالبيورين Purine فى الشريط العلوى وهو بذلك مشابهاً للفيروسات الأخرى شاملاً سيادة تنابع الأدينين والذى هو عال القابلية للإنشطار بواسطة RNase U₂ خلال تفاعلات التنابع. أما الخيط السفلى فيه سيادة تنابع الأدينين كما فى CCCVd. الخيط السفلى فيه نطاق P بالنسبة للفيروسات الأخرى غنى فى تنابع اليوردين Uridine وهذا يعكس ولو جزئياً مقدرة هذا الفيروس على مهاجمة عوائل وحيدة الفلقة monocotyledonous كما فى CCCVd مقابل العوائل ثنائية الفلقة فى الفيروسات الأخرى.

وبالمقابل ففى الفيروسات الأخرى، فإن الجزء من جزئ الفيروس الأكثر حفظاً بين CTiVd و CCCVd متوافق مع أكثر النطاقيات تغيراً وهو نطاق V فى بقية الفيروسات. إحدى الاحتمالات أن نطاق V فى CCCVd يحتوى تنابعات أساسية للمضاعفة الجزئية للتنابع المفترضة لتنشأ من جديد أثناء إصابة أشجار جوز الهند بواسطة CCCVd. إن حدود هذه التضاعفات تحدث فى نطاق V وفى وسط نهاية العروة فى نطاق T₂ من CCCVd. إن الفيروس CTiVd الذى يهاجم أشجار جوز الهند يمكن أيضاً أن يودى إلى إعادة اتحاد مماثلة فى RNA. إن الأشكال الدائرية والمستقيمة لفيروس CTiVd مشابهة لتلك الموجودة فى CCCVd، إلا أن RNA المستقيم يكون تركيزه منخفضاً ولكن مساوياً فى حجمه لإحدى تنوعات CCCVd مع نهاية أول ٥٠ نيوكليوتيدة.

للفيروس CTiVd عزلتان والفرق الوحيد بين العزلتين المأخوذتين من أشجار مختلفة من جوز الهند هو تغير U مكان A فى الموقع ١١٧ وتغير U إلى C فى نهاية النيوكليوتيدة ١٢١، بهذه المواقع يمكن التمييز بين العزلتين.

٤ - فيروسات الأقحوان

Chrysanthemum Viroids

١ - مرض تقزم الأقحوان

Chrysanthemum Stunt Disease

مقدمة :

يعتبر مرض تقزم الأقحوان من أوائل الأمراض الفيروسية المكتشفة وله تاريخ في تطور الأبحاث الفيروسية يشبه تاريخ الأبحاث التي أجريت على مرض الدرنه المغزلية في البطاطس.

كان أول وصف لهذا المرض سنة ١٩٤٧ وذلك من قبل العالم Dimock ووصفه على أنه مرض معدى وذلك اعتماداً على تجارب النقل بالتطعيم. وفي سنة ١٩٤٩ ذكر العالم Olson أن العامل المسبب لهذا المرض ينتقل بواسطة حك الورقة بورقة أخرى مصابة، وهذا أكدته علماء آخرون بحثوا في هذا المرض منذ سنة ١٩٥٠ إلى سنة ١٩٥٣. ولقد وجد أنه من بين ٧٦ نوع نباتي مزروع من العائلة المركبة، كان هناك ٣٩ نوعاً فقط قابل للإصابة بهذا المرض. من هذه الأصناف سبعة (خمسة أصناف *Chrysanthemum* وصنفان *Senecio*) يتكشف عليها أعراض مميزة واضحة جداً. حاول كثير من العلماء استعمال إختبار البقع الموضعية Local lesions فوجدوا أن هذا الإختبار لا ينطبق على الأعراض المرضية لهذه النباتات إلا أنه في سنة ١٩٦٨ فإن العالم Lawson et al اكتشف بقع موضعية نشوية على أوراق النباتات المحقونة من نوع *Senecio cruentus* بعد حقنها بعامل التقزم ولكنه وجد أن هناك إختلاف في عدد البقع بين الحوامل الزهرية وبين الأوراق في نفس

النبات السابق قال إن استعمال هذه البقع فى دراسة المسبب يعوق الكشف عن الكميات الصغيرة فى تركيز عامل التقزم. ونظراً لعدم وجود العائل الملائم للإختبارات الحيوية وتشخيص المرض تأخر الكشف عن، ومعرفة طبيعة مسبب المرض. ذكر بعض الباحثين سنة ١٩٥٢ أن عامل التقزم غير طبيعى فى لباته للحرارة ولم يفقد حيويته حتى بعد غلى المستخلصات المأخوذة من النباتات المصابة، وذكر أيضاً أن حيوية الفيرويد تعود إليه ثانية فى المستخلصات المعاملة بالكحول.

حاول العالم Hollings ومساعدوه سنة ١٩٦٤ تنقية عامل التقزم عن طريق الترسيب بمادة كبريتات الأمونيوم ثم استعمال آلة الطرد عن المركز المجزئة ثم المعاملة بمذيبات عضوية. كذلك حضرت مستخلصات الفينول لتحديد فيما إذا كان العامل المسبب للمرض يمكن نقله بهذه المستخلصات أم لا. وذكر نفس العالم أنه ولا أى من هذه المستخلصات كان معدياً. مع أن هناك أجزاء صغيرة جداً مشابهة لتلك الموصوفة لفيرس الذبول المتبقع فى الطماطم وجدت فى النباتات المريضة ولكنها لم توجد فى النباتات السليمة، إلا أنه لم يتوفر الدليل بأن هذه الأجزاء معدية. وفى سنة ١٩٦٨ استطاع نفس العالم المذكور إجراء عملية استخلاص من النباتات المريضة باستعمال ١,٠ مول منظم فسفاتى ثم معاملة المستخلص بمادة Chloroform butanol وحصل على عائم شديد العدوى. أما المستخلصات المحضرة فى ٠,٠٢ مول منظم فسفاتى لم تكن معدية. كانت الحيوية والمقدرة على العدوى موجودة فى الحبيبات الداخلية من اللب المتجانس والمعاد استخلاصه فى خللاط والمعامل بمادة Chloroform butanol والمنقى باستعمال السرعة البطيئة لآلة الطرد عن المركز، أما الجزء العائم من المادة التى تم استخلاصها لم تكن معدية.

ذكر العالم Holling أن حيوية عامل التقزم فقدت فى مستخلصات خام مكونة من ٠,٠٠٥ مول منظم فسفاتى معامل بـ RNase (3ug / ml) ولكن إذا كان المنظم ٠,٥ مول ونفس تركيز الأنزيم لا تفقد الحيوية.

استمرت الأبحاث فى هذا المجال حتى سنة ١٩٧١ حيث ذكر Lawson & Hearon أنه لا يوجد فيروس فى النباتات المتقزمة، عندئذ سارت الأبحاث فى هذا

المرض موازية للأبحاث على مرض الدرنه المغزلية فى البطاطس وكذلك مرض اكسوكورتز الحمضيات. بعد أن تم إكتشاف أن مرض الدرنه المغزلية فى البطاطس يتسبب عن فيروسات اتجهت الأبحاث عن فيروس مسبب لمرض تقزم الأقحوان، وفعلاً ثبت أن هذا المرض يتسبب عن فيروس وسمى فيروس تقزم الأقحوان (CSVd) Chrysanthemum Stunt Viroid وذلك من قبل العالم Diener & Lawson سنة ١٩٧٣.

الأعراض:

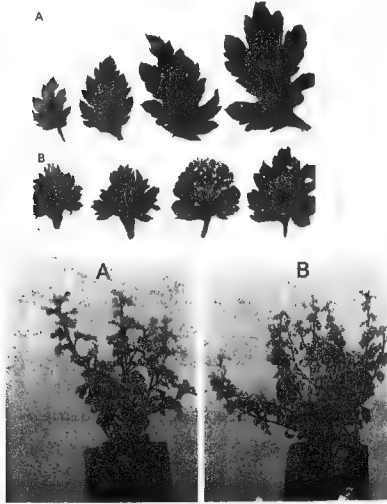
يوجد هذا المرض فى كل من الولايات المتحدة، كندا، Netherland، جنوب أفريقيا، إيطاليا والبرازيل. يسبب المرض خسائر تتراوح من نسبة بسيطة إلى نسبة عالية فى زراعات الأزهار وفى الأقحوان المزروع فى الحدائق وإذا لم تؤخذ الاحتياطات والمراقبة فيمكن أن يصل المرض إلى نسبة وبائية عالية.

تكون نباتات الأقحوان وزهارها أصغر من النباتات السليمة وأكثر شحوباً وذات نوعية أدنى بالمقارنة مع النباتات العادية، بعض الأزهار قد تظهر مائلة للون الأبيض (مبيضة). تتفتح الأزهار المريضة مبكراً عن الأزهار العادية بمدة ٧ - ١٠ أيام. غالباً ما تنمو البراعم الجانبية قبل الألوان وتنتج أعداداً كبيرة من الفروع والمدادات (شكل ٦٠). يظهر على بعض الأصناف ندباً بيضاء أو يظهر تلطخات صفراء على الأوراق. تكون العقل المأخوذة من النباتات المصابة ضعيفة التجذير وتظهر النباتات المصابة تغيرات فى الميتابولزم وفى بدايات الكاسيوميوم. غالباً ما تتقزم النباتات بعد إبتداء الإصابة بحوالى شهر أو أكثر وإن هذه الصفة (التقزم) تكون السائدة لغاية موت النبات ولذا سمي المرض باسم مرض تقزم الأقحوان.

الكائن الممرض:

يتسبب هذا المرض عن فيروس تقزم الأقحوان (CSVd) Chrysanthemum stunt Viroid يتكون من ٣٥٤ - ٣٥٦ نيوكليتيده وذلك حسب العزلات. ينتقل هذا الفيروس عن طريق العصارة. نقطة التخفيف القصى للفيروس حوالى ١ : ١٠٠٠٠، درجة الحرارة المميتة ٩٦ - ١٠٠ م لمدة عشرة دقائق. يحتفظ الفيروس بمقدرته على إحداث إصابة لمدة شهرين فى العصارة ولدة سنتين فى

الأوراق الجافة. ينتشر الفيرويد بسهولة فى العصارة المحمولة على الأصابع أو على السكاكين أو الأدوات الزراعية المستعملة أثناء العمليات الزراعية مثل التقليم، تشذيب النباتات، أخذ العقل، قطف الأزهار. لا ينتقل الفيرويد بالحشرات أو نواقل أخرى.



شكل رقم ٦٠ :

أعراض الإصابة بفيرويد تقزم الأقحوان على نبات الأقحوان.
 العلوى : A: أعراض الإصابة بالفيرويد CSVd على أوراق الأقحوان مراحل مبكرة.
 B: أعراض الإصابة بالفيرويد CSVd على أوراق الأقحوان مراحل متأخرة.
 السفلى : A: نبات الأقحوان سليم. B: نبات الأقحوان مصاب بالفيرويد ويظهر عليه أعراض كثرة
 الفروع والتقزم.

يتحرك الفيريويد ببطء خلال النبات وغالباً ما يحتاج إلى ٥ - ٦ أسابيع ليتحرك خارج الورقة المحقونة ويصل الساق. تتكشف الأعراض الجديدة بعد ٣ - ٤ شهور من الإصابة. يبقى الفيريويد حياً أساساً في النباتات المصابة التي يبدو أنها معمرة وتحمله إلى الموسم القادم. يمكن أن تتلوث النباتات أيضاً بالفيريويد من أجزاء النباتات الميتة.

يصيب الفيريويد كل من الأقحوان والطماطم ونبات *Gynura*.

كما في بقية الفيريولات فإن هذا الفيريويد له شكلان الأول دائري والثاني مستقيم وإن هذين الشكلين قد إختبرا لمعرفة حيويتهما على نبات *G. aurantiaca* وإن جدول رقم ٣٧ يبين أن كلا الشكلين لهما كفاءة متساوية في الإصابة، وهذا ما يؤدي إلى القول بالغاء ما كان يعرف بأن كفاءة الشكل المستقيم كانت ناتجة عن إختلاط الشكل الدائري مع الشكل المستقيم. أمكن استخلاص ٢٠٠ ميكوغرام شكل دائري من كل كيلوغرام من المادة النباتية الحية المصابة بالفيريويد وكذلك استخلاص ٣٥ ميكوغرام شكل مستقيم من كل كيلوغرام من المادة النباتية الحية المصابة بالفيريويد.

عند فحص مستحضرات نقية من فيريويد CSVd بالميكروسكوب الإلكتروني فإن الجزيئات الدائرية المدترة تشاهد مع بعض الجزيئات المستقيمة. تكون بعض الجزيئات المستقيمة أكثر سمكاً من الجزيئات الدائرية. الجزيئات الأطول والأقل سمكاً هي الأشكال المدترة للشكل المستقيم المشكل بواسطة عملية ال nicking للجزيئات الدائرية خلال ١٥ - ٢٠ ثانية من التحضين في ٩٨٪ Formamide على درجة ٦٠م التي هي ضرورية للتفريد. أما بالنسبة للأشكال المستقيمة من الفيريويد فهي الأسرع هجرة في الجيل.

جدول ٣٧: نتائج إختبارات الشكل الدائري والمستقيم من فيرويد تقزم الأقحوان على نبات *G. aurantiaca*.

شكل الفيرويد المختبر	تركيز الفيرويد المختبر (ميكوغرام / مل) حيوية الإصابة به %					
	٥	١	٠,٥	٠,١	٠,٠٥	٠,٠٠٥
شكل دائري	2100	—	2100	—	270	217,8
شكل مستقيم	2100	—	2100	—	282	—
شكل دائري	—	270	—	260	—	217,8
شكل مستقيم	—	2100	—	200	—	218

الأعراض التشريحية:

لدراسة الأعراض التشريحية لفيرويد تقزم الأقحوان، يستعمل أنواع من نبات الأقحوان حساسة للفيرويد وتكون كاشفة له بحيث أن أعراض الإصابة الفيرويدية تكون نموذجية على هذا النبات. ومن أهم الأصناف التي تعتبر كاشفة لهذا الفيرويد هو الصنف Bonnie Jean.

تجرى الدراسة التشريحية على نبات الأقحوان المصاب بالفيرويد بعد ظهور الأعراض عليه، إن التعبيرات المرضية بالأعراض تحدث بعد أربعة أسابيع من الحقن عندما تبدأ النباتات المحقونة بالفيرويد CSVd في إظهار إنحناء شديد في الساق. خلال الفترة من ٤ - ١٠ أسابيع بعد الحقن فإن النباتات غالباً ما تتقزم ويظهر تبع وتبرقش على الأوراق العلوية وأخيراً على الأوراق السفلية. لا يلاحظ سلوك متناسق من الأعراض يتبع ذلك.

عندما يؤخذ جزء القمة المرستيمية من النباتات المحقونة بالفيرويد ويقارن شكلها غير الطبيعي مع تلك المأخوذة من النباتات غير المحقونة، يلاحظ بالمقارنة أن القمم المرستيمية في النباتات المحقونة تكون ملتوية ومتقرمة وأحياناً مشوهة. يمكن اكتشاف الفيرويد CSVd بواسطة الهجرة الكهربائية في الجيل بعد ٣ أسابيع من الحقن في

جميع النباتات المحقونة أما النباتات غير المحقونة فلا يلاحظ الفيرويد في مستخلصاتها.

لكي ندرس الأعراض التشريحية في النباتات المصابة بالمرض يجب أن نقارن بين الصفات التشريحية للنباتات السليمة والمصابة. لذا يجب أن نذكر الآن الصفات التشريحية للنباتات السليمة ثم التغيرات التشريحية في النباتات المصابة ونقارن بينهما. **تشريح النباتات غير المريضة:**

عند عمل مقاطع طولية وعرضية في الساق وفحصها لتحديد الوضع التشريحي لساق نبات الأقحوان صنف Bonnie Jean فإن تشريح الساق يشبه ما ذكره كل من Mandalay و Delaware. المقاطع العرضية في أنسجة العرق الوسطى للورقة في مناطق القمة النامية والقاعدة أظهرت أن البشرة العلوية والسفلية كل منهما يتكون من طبقة مفردة من الخلايا. تكون الخلايا البرانشيمية السياحية Palisade متطاولة إلى مثلثة الشكل منضغطة في ترتيبها. أما الميزوفيل الإسفنجي يكون فيه فراغات بين الخلايا ويتكون من خلايا غير منتظمة الشكل. أما الحزم الوعائية فتتكون من غلاف الحزمة، اللحاء، الكامبيوم الوعائي والخشب.

عند فحص سلسلة مقاطع طولية من مرستيم خضري وآخر تكاثري فإن المقاطع الوسطى من المرستيم التكاثري تتكون من واحدة أو إثنين من الطبقات الرقيقة وصف من الخلايا مكونة مرستيم العرق ومنطقة جانبية على كلا طرفي منطقة النسيج المتوسط. يختلف تشريح المرستيم التكاثري عن المرستيم الخضري في عرض وإساع القمة والذي من هذه المنطقة تنشأ مكونات الزهرة.

تشريح النباتات المحقونة بالفيرويد CSVd:

١ - الساق:

التغيرات التشريحية في النباتات المصابة بالفيرويد CSVd تظهر بعد أربعة أسابيع من الحقن ولكن تكون أكثر وضوحاً في العينات المأخوذة للفحص بعد ٧ أسابيع

من الحقن. تحدث أكثر التغيرات وضوحاً في الجزء العلوى من النبات. يكون الكامبيوم الوعائى أكثر وأول الأنسجة المتأثرة ويبدو أن التغيرات في الكامبيوم هي المسئولة عن التغيرات اللاحقة في الأنسجة الأخرى. أما التغيرات التشريحية في الخشب واللحاء والقشرة لا تكون شديدة مثل تلك الملاحظة في الكامبيوم الوعائى. يلاحظ في الجزء السفلى من النبات أحياناً خلايا متضخمة بين خلايا الألياف سميقة الجدار من غطاء الحزمة الوعائية، هذه الخلايا المتضخمة غالباً ما تكون خلايا ذات جدر مميزة بوضوح والأنوية فيها لا تكون دائماً واضحة أو مرئية.

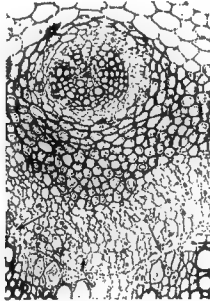
في الجزء العلوى من النبات، فإن خلايا الكامبيوم في الحزم الوعائية تظهر مشوهة ومن الصعب تمييزها عن خلايا اللحاء والخشب المجاورة لها. في مناطق أخرى تظهر الخلايا في الكامبيوم الوعائى كأنها مطبونة (شكل ٦١). الاختلال الوظيفى للكامبيوم الوعائى يكون واضح في الحزم الوعائية في النسيج المصاب، والبدائيات الكمبيومية كثيراً ما تكون غير واضحة وتفتقر إلى الجدر الخلوية المميزة (شكل ٦٢). يحدث تحطيم للبدائيات الكمبيومية بالإضافة إلى التميز غير الكامل في البدائيات الكمبيومية. وهذا يؤدي إلى تكوين نسيج يتكون من خلايا ذات جدر رقيقة تكون غالباً مستطيلة الشكل متعامدة في صفوف. خلايا برانشيما الخشب غالباً ما تكون سهلة الصبغ ومتضخمة.

النباتات المصابة والتي تظهر أعراض خارجية بكثرة على جانب واحد من النبات، غالباً ما تظهر تغيرات تشريحية شديدة في نفس الجانب من النبات. في هذه المناطق يكون النسيج الوعائى قد أحتل بواسطة خلايا متضخمة، والأنوية في هذه الخلايا متطاولة وقابلة للصبغ. يتجمع البكتين في جيوب في مركز النسيج المتضخم والذي ازداد عدده الموجود في الأجزاء القمية في الساق وبقايا النسيج الوعائى يلاحظ في مركز هذه الجيوب.

في المقطع الطولى فإن الكامبيوم الوعائى عادة يتكون من بدايات شاذة ولكن أيضاً تتميز بتكثف خلايا متضخمة. في كثير من المقاطع فإن نسيج اللحاء يكون قابل للصبغ والاختبارات الهستوكيماوية للكالموس تكون موجبة. تظهر المقاطع

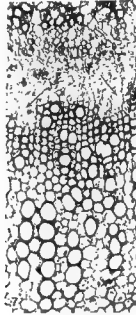
الطولية فى الأنسجة تغيرات تشريحية أقل شدة وتتكون من جيوب ذات مواد داكنة اللون (الصبغة) والتي تعطى إختبار موجب للبكتين. يظهر فى المقاطع الطولية أيضاً خلايا متضخمة من الخلايا البرانشيمية للخشب. هناك تغيرات تشريحية أخرى تشمل مناطق من خلايا متضخمة ومواد داخل الخلايا ذات لون داكن فى القشرة شكل ٦٣. المواد ذات الصبغة الداكنة تعطى نتيجة موجبة لإختبار الصمغ الجرحى وفى بعض الحالات تعطى إختبار موجب للبكتين مستعملة إختبارات Orcinol و Iron absorption. تكون طبقة الابديرم احادية الخلية قد استبدلت فى بعض الأحيان بطبقة عديدة الخلايا أو غالباً بواسطة فجوات محتوية Wound gum ويكتين. التكاثر الخلوى لهذا النوع يكون واضحاً فى المقاطع الطولية.

فى بعض المقاطع يكون هناك كتلة من الخلايا مشابهة فى مظهرها تلك التى فى نسيج القمة المرستيمية محل محل مكونات النسيج الوعائى. هذه المناطق غالباً ما تصنف بوجود خلايا ذات صبغة داكنة تحتوى أنوية كبيرة واضحة وتمتد خلال النسيج الوعائى فى القشرة.



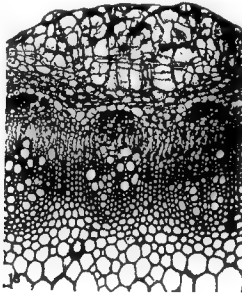
شكل رقم ٦١ :

مقطع يظهر التميز غير الكامل فى بدايات الكامبيوم وتحطيم وتكسر الخلايا فى الكامبيوم الوعائى فى ساق نبات الأتحران المصاب بفيرويد CSVD (يلاحظ الأسهم). التكبير ٢٦٥ مرة.



شكل رقم ٦٢ :

مقطع يظهر الفجوات في الكامبيوم الوعائي في ساق نبات الأقحوان المصاب بفيروس CSVd
يلاحظ الأسهم. التكبير ٢٨٠ مرة.



شكل رقم ٦٣ :

مقطع عرضي في ساق نبات الأقحوان المصاب بفيروس CSVd يظهر تضخم الخلايا وزيادة
عددها في القشرة والمواد ذات الصبغة الداكنة. التكبير ١٦ مرة.

٢ - القمة المرستيمية:

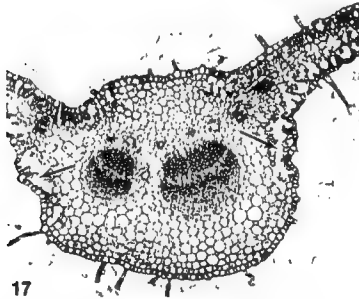
أكثر الاستجابات شيوعاً في العائل عند الإصابة الفيرويدية تلاحظ في المرستيمات الخضرية حيث تتكون فجوات عمودية تمتد خلال مرستيم العرق الوسطى والقمة. إن عدد وحجم هذه الفجوات يختلف من مرستيم إلى مرستيم. أما في المرستيم التكاثرى فإن استجابة العائل للإصابة تكون كما ذكر في المرستيم الخضري وتلاحظ الفجوات بشكل عام. الخلايا في نسيج المرستيمات التكاثرية من النباتات المصابة غالباً ما تكون أقل تماسكاً في ترتيبها من ذلك الملاحظ في النباتات غير المحقونة.

٣ - الأوراق:

التغيرات التشريحية في الأوراق الحديثة ذات البثرات المصفرة تشمل تحطيم خلايا الميزوفيل شكل ٦٤. وإن الفجوات المتكونة غالباً ما تكون مرتبطة مع الجانب البعيد عن المحور مباشرة في الجهة الداخلية للبشرة الخارجية السفلى. في بعض مناطق صفحة الورقة يكون الايدرمز السفلى منفصلاً عن بقية النسيج بواسطة هذه الفجوات، بينما في مناطق أخرى فإن خلايا الميزوفيل المتطاولة تعمل جسر أو كوبرى يصل هذه الفجوات من الميزوفيل الاسفنجى إلى الايدرمز السفلى. في بعض المقاطع فإن خلايا الميزوفيل السياجية تكون أقل تلاحماً في ترتيبها منها في الأوراق من النباتات غير المصابة بالفيرويد.

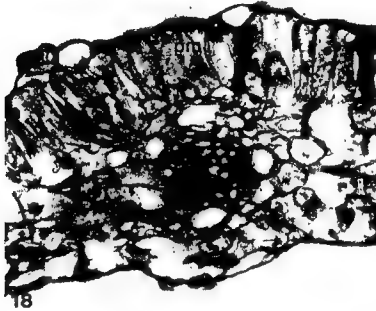
أما في الأوراق التي التحمت فيها البقع الصفراء فإن خلايا الميزوفيل النسيجية تكون غير منتظمة الشكل والحجم وفي بعضها تكون الخلايا متطاولة شكل ٦٥. تكون طبقات الابدريمز دائماً غير واضحة في الأوراق المظهرة أعراض شديدة. في بعض المقاطع يكون هناك خلايا ميزوفيل مفردة متحطمة وتكون البلاستيدات الخضراء والأنوية أقل وضوحاً في هذه الأنسجة منه في خلايا الميزوفيل في نسيج ورقة من نباتات غير محقونة. البلاستيدات الخضراء والأنوية تكون غير مميزة في خلايا الميزوفيل في النباتات المصابة.

يمكن القول بأن التغيرات التشريحية تدل على أنه يمكن أن يكون هناك فرق مميز بين التغيرات التشريحية الأولية والثانوية، التغيرات التشريحية التي تحدث في الأنسجة المرستيمية والكامبيوم الوعائي ومرستيم الفروع يمكن اعتبارها تغيرات أولية. أما التغيرات التي تلاحظ في الأنسجة الأخرى يمكن اعتبارها تغيرات ثانوية. إن ظهور الأنوية المتضخمة وتمزق النسيج المرستيمي يؤدي إلى القول بأن هذا تعبير عن النشاط المباشر للفيروس من حيث بناء ال RNA أو تضاعفه في نواة خلية العائل. هذه التغيرات يمكن أن تكون ناتجة من عوامل أخرى مثل عدم التوازن الهرموني وتسمى تأثيرات ثانوية. يمكن القول بأن التغيرات المحددة في نباتات الأقحوان المصابة بالفيروس تكون مشابهة لتلك المتسببة عن الإصابة بالفيروسات المختلفة في العائل النباتي.



شكل رقم ٦٤ :

مقطع عرضي في نصل الورقة من نبات أقحوان مصاب بفيروس CSVd يظهر تضخم نسيج الميزوفيل على الجانب القمي من اليمين. يلاحظ الأسهم. التكبير ١١ مرة.



شكل رقم ٦٥ :

مقطع عرضي فى نصل الورقة من نبات أقحوان مصاب بفيروس CSVd يبين استطالة الخلايا الساجية، وتضخم طبقات الأندودير. التكبير ٥٧ مرة.

استعمال فيروس CSVd فى تقليل الإصابة ببكتريا العفن الطرى :

يعتبر مرض تقزم الأقحوان الفيرويدي والإصابة البكتيرية (العفن الطرى) من الأمراض الهامة التى تصيب الأقحوان وتؤثر على إنتاج الأزهار فى النوع *Chrysanthemum morifolium* وإن معظم الدول تمنع فى الحجر الزراعى دخول الأجزاء النباتية من الأقحوان إذا كانت تحمل ببكتريا *Erwinia Chrysanthemi* وكذلك إذا كانت تحمل فيروس تقزم الأقحوان CSVd.

إن ببكتريا *E. chrysanthemi* هى ببكتريا العفن الطرى القادرة على إفراز أنزيمات بكتينية (محللة للبروتين) وتسبب تضخم البرانشيما الوعائية وتحلل النخاع. لقد وجد أن انخفاض التفكك فى النخاع الناتج من الإصابة البكتيرية فى عقل الأقحوان المصابة بالفيروس CSVd له علاقة بوجود الفيروس نفسه فى النبات.

لدراسة تأثير الإصابة الفيرويدية على تحلل النخاع في عقل الأقحوان صنف Bonnie Jean بواسطة بكتيريا العفن الطرى *E. chrysanthemi* سلالة ١٥٨. تؤخذ عقل من النباتات ذات عمر ٣ أسابيع والتي نشأت من أصول نباتات إما سليمة أو مصابة بالفيرويد CSVd ولكنها مصابة بالبكتيريا ويلاحظ أعراض الإصابة البكتيرية عليها وذلك بأن يظهر على النخاع عفن أحمر داكن طرى بالإضافة لتلون الحزم الوعائية فوق النقطة حيث ينتهى عفن النخاع. لا يظهر أعراض على أنسجة الساق الخارجية.

تبين من الدراسة أن العفن الطرى الذى حدث فى السيقان المصابة بالفيرويد CSVd كان تقريباً ثلث الكمية التى تحدث فى النباتات غير المصابة بالفيرويد. وجد فى إحدى التجارب أن طول النخاع المتحلل (بواسطة البكتيريا) فى النباتات غير المصابة بالفيرويد ١٧,٨ ملم فى حين كان طوله فى النباتات المصابة بالفيرويد ٥,٨ ملم وفى تجربة أخرى كان طول النخاع المتحلل فى النباتات غير المصابة بالفيرويد ٢٢,٦ ملم فى حين أنه كان فى النباتات المصابة بالفيرويد ٧ ملم.

العلاقة بين الفيرويد الموجود فى النبات وخفض تحلل النخاع بالبكتيريا:

بعد عشرة أيام من زراعة ٢٠ نبات سليم فى أوعية، يغرّز فى هذه النباتات أقراص نسيجية (تحقن) إما من أصول سليمة أو من أصول نباتية مصابة بالفيرويد. كان يتم الحقن على بعد ٣٥ ملم تحت قمة الفرع الطرفية. تحفظ جميع النباتات على درجة حرارة ٢٩ - ٣٠ م وطول نهار ١٦ ساعة. تزال الأفرع الطرفية بعد عشرة أيام من الحقن وهذا يؤدى إلى تكوين أفرع جانبية. بعد ١٠، ٢٠، ٢٦، ٣٤ و ٤١ يوم بعد الحقن يؤخذ فرع قمى واحد أو جانبى من كل نبات من فوق منطقة الحقن. يؤخذ ٢ غرام من نسيج نصل الورقة ويستعمل للكشف عن الفيرويد. فهرسة النباتات السليمة على ١٠، ٢٠ و ٤١ يوم فقط. يؤخذ قطع من الساق بطول ٥ ملم من قاعدة كل عقلة وتوضع فى مثبت للدراسة الهستولوجية.

الجزء الباقي من الفرع (الساق + أعناق الأوراق) يقطع على بعد ٤٠ ملم تحت القمة وتحقن بالغمر (بالبكتيريا) لإجبار التفكك البكتيرى.

تبدأ النباتات المحقونة بالفيرويد تظهر الأعراض بعد ٢٧ يوم من الحقن، أما حدوث الأعراض واكتشاف الفيرويد يتم بعد ٣٤ و ٤١ يوم بعد الحقن كما هو واضح فى جدول ٣٨ وتبين أن تفكيك النخاع البكتيرى قد خفض معنوياً فى حالتين إما باكتشاف CSVd فى نسيج الورقة بطريقة PAGE أو بالتعبيرات العرضية للمرض الواضحة للفيرويد. وبشكل عام فإن هناك خفض قليل فى تفكك النخاع قد حصل عليه فى العقل المأخوذة من نباتات محقونة بالفيرويد، ولكن الخفض يكون أكثر إذا كانت العقل مظهرة أعراض الإصابة الفيريودية وتحتوى على كمية يمكن تقديرها من الفيرويد (تكاثر فيها الفيرويد بكمية كبيرة). الأعراض المرئية (بقع صفراء) تظهر إما لفترة قصيرة قبل أو فى نفس الوقت الذى يكون فيه عيار الفيرويد المكتشف بواسطة إختبار PAGE كاف لأن يسبب ظهور الأعراض.

جدول ٣٨: العلاقة بين تعبيرات الأعراض واكتشاف الفيرويد CSVd، ٣٤ و ٤١ يوم بعد حقن الأقحوان بالفيرويد.

بعد ٤١ يوم من الحقن		بعد ٣٤ يوم من الحقن	
أعراض الورقة	اكتشاف الفيرويد	أعراض الورقة	اكتشاف الفيرويد
صفر	—	صفر	—
١	—	صفر	—
١	—	صفر	—
١	—	صفر	—
٢	+	صفر	—
٢	+	صفر	—
٣	+	١	+
٣	+	٢	+
٣	+	٢	+
٣	+	٣	+

ملاحظات:

صفر = لا يوجد أعراض، ١ = قليل من البقع على ورقة أو ورقتين، ٢ = بقع على عدة أوراق، ٣ = كثير من البقع على كل الأوراق، + = يمكن اكتشاف الفيرويد، - = فيرويد غير مكتشف.

إعادة اكتشاف البكتيريا من العقل المحقونة:

أمكن عزل البكتيريا *B. Chrysanthemi* سلالة ١٥٩ المحقونة في العقل النباتية باستمرار من المقطع الأول والثالث (كل مقطع يمد ٨ ملم عن المقطع الآخر وذلك ابتداءً من القاعدة) من العقل غير المصابة بالفيرويد والمحقونة أيضاً بالفيرويد CSVd. لم يمكن عزل البكتيريا من المقطع الخامس. هذه النتيجة تدل على أن البكتيريا الموضوعة على القاعدة في العقل السليمة والمحقونة بالفيرويد تتحرك لنفس المسافة العمودية تقريباً وتكون ذات مقدرة على البقاء حية على الأقل خمسة أيام ضمن العقل.

الاختبارات الهستولوجية:

لم يلاحظ إختلافات تشريحية بين السيقان السليمة والمحقونة بالفيرويد وقت الحقن. إن تشريح سيقان حديثة نموذجية من الأقحوان صنف Bonnie Jean، لوحظ في المقاطع العرضية أنها تختلف قليلاً فقط عن الصنف 4 Giant وهو النموذج الأمثل للتشريح. في سيقان Bonnie Jean يبدأ النخاع في قاعدة الحزم الوعائية بقليل أو بدون ألياف extraxylary تفصل بين النخاع وقاعدة الحزم الوعائية. المقاطع في السيقان المتقدمة بالسن تظهر أغطية للحزمة في الألياف الناضجة، مناطق كبيرة في النسيج الوعائي Interfascicular وكثير من الألياف Extraxylary.

في سيقان العقل السليمة يبدو أن البكتيريا تتحرك إلى أعلى في النخاع وتفكك النسيج. كذلك فإن البكتيريا تتحرك ضمن عناصر الأوعية الخشبية، حيث أنها وجدت ضمن الأوعية فوق المنطقة المكتشف فيها تعفن النخاع. تحطيم الأوعية تسبب بواسطة البكتيريا عن طريق تحطيم الأوعية الداعمة لنسيج برانشيما الخشب ثم تنتشر من الحزم الوعائية وتفكك النخاع القريب من الخلايا. يكون تفكك الحزم الوعائية والنخاع شديداً بعد خمسة أيام من الحقن بينما الأنسجة الأخرى تظهر غير متأثرة.

وعلى النقيض من ذلك فإن البكتيريا فى العقل المصابة بالفيروس تبقى محددة بشدة مع العناصر الوعائية التى تكون على شكل مستعمرات أولية وتسبب كمية قليلة من تحلل النخاع فى قاعدة العقلة ولكنها لا تستمر فى الحركة إلى القمة البعيدة. لوحظت البكتيريا ضمن تجاويف العناصر الوعائية، ولكن قليل من الخلايا من برانشيما الخشب، الكامبيوم، اللحاء أو النخاع تحطمت بعد خمسة أيام. الاختبارات الهستولوجية أظهرت عدم وجود إختلافات كبيرة بين مقاطع الساق المصابة والخالية من الفيروس CSVd.

هل هذه الظاهرة وقاية بالتضاد؟؟

إن هذه الظاهرة تختلف عن ظاهرة الوقاية بالتضاد Cross - Protection، حيث أنه فى الأخيرة يكون الكائنين الداخلين فى التجربة ذوى علاقة قريبة من بعضهما البعض مثل سلالات لفيروس أو فيروس معين، ولم يسبق أن استعمل فيروس فى مقاومة أو تخفيض أعراض متسببة عن كائنات أخرى، فى حين أن الفيروسات استعملت فى تخفيض أو زيادة شدة الإصابة بالفطريات.

فى هذه التجربة فإن بكتيريا *E. Chrysanthemi* سلالة ١٥٩، بكتيريا العفن الطرى تمتلك أنزيمات بكتينية والتى يمكن أن تحطم الصفيفة الوسطى Middle lamellae فى الخلايا الراناشيمية مؤدية إلى موت الخلية وفقد إنتفاخ النسيج وبالتالي فإن هذه الأنزيمات تؤثر على الأنسجة العصارية فى الأقحوان (النخاع والبرانشيما الوعائية)، بينما الجدر ذات اللجننة العالية تكون أكثر مقاومة للبكتيريا. عندما تفقد الأنسجة عصاريتها وتتشقق أنسجة الساق فإن استعمالها يكون صعب من قبل البكتيريا وبالتالي يمكن أن نتوقع تكاثر الفيروس وتحركه خلال النباتات المحقونة الناتجة من فقد صفة العصارية، وبالتالي فإن هذا التكاثر يمكن أن يكون كافياً لمنع أو خفض الأنزيمات البكتيرية المخطمة والتى عادة تؤدى إلى العفن الطرى.

لوحظ فى المقاطع المثبتة والمأخوذة من الساق بعد ٨٤ يوم من الحقن بالفيروس CSVd أنها أظهرت كثيراً من Extraxylary fibers وقلنسوة ناضجة للحزمة الوعائية

بالإضافة لزيادة سمك الجدر الخلوية. وعلى أية حال فإن الاختلافات في التشريح العام والذي يمكن أن يحسب لصالح الخفض في كفاءة البكتيريا لا يبدو واضحاً في تجارب مقاطع الساق السليمة والمحقونة بالفيروس. إن التغيرات الكبيرة في تركيب الساق والتي تحدث من الإصابة لا تظهر مبكراً بوقت كاف ليكون متزامناً مع العلاق بالفيروس المكتشف وتخفيض تفكك النخاع. إذا كان الفقد في عصارية السيقان المصابة بالفيروس CSVd داخلياً في هذا الموضوع، فمن الصعب تحديد العامل أو العوامل المسؤولة عن الخفض في التفكك. بينما الفرصة لاكتشاف الفقد أو الحصول على كميات صغيرة من مكونات الجدر يمكن أن تكون قليلة، هذه التغيرات يمكن أن تؤثر كثيراً على مقدرة التفكك للبكتيريا.

إن نتائج الدراسات الهستولوجية للمقاطع المصابة بالبكتيريا، يبدو أنها تدل على أن ارتباط أو تجمع البكتيريا في النباتات المصابة بالفيروس في عناصر الأوعية الخشبية وإن فشل البكتيريا في تمزيق العناصر الوعائية بانطلاقها المتتابع في خلايا النخاع يؤدي إلى القول بأن هناك تغير في تركيب الوعاء. لقد ذكر بعض الباحثين أن بعض نباتات الأقحوان تنتج مادة السوبرين في جدر الأوعية كجزء من إستجابة العائل للإصابة البكتيرية. إن العناصر الوعائية في نبات الأقحوان السليمة تفتقر إلى مادة السوبرين بكميات يمكن تقديرها ولم يوجد مثل هذه التغيرات يمكن أن تحدث في أوعية النباتات المصابة بالفيروس. زيادة على ذلك فلقد وجد أن مسبب مرض بيرس في العنب يؤدي إلى إنتفاخ الأغشية المغلفة للنخاع وقلل ميكانيكي للنخاع بواسطة إنتاج الكثير من الصمغ أو الجيل، ولا يوجد أى دليل على أن الفيروس يسبب إنتاج صمغ أو تغير في النخاع والذي يمكن أن يؤدي إلى إعاقة حركة البكتيريا خلال نسيج النبات. إن بقاء البكتيريا حية في النباتات المصابة بالفيروس يكون دليل ضد إفراض أن هناك مواد خاصة تنتج تكون مميتة للبكتيريا. إن دراسة التكاثر البكتيري والانتاج الأنزيمي في النسيج المصاب يمكن أن يظهر أن البكتيريا إما أن تكون غير قادرة على إنتاج كميات عادية من الأنزيمات المحللة أو أن هذه الأنزيمات تكون غير قادرة على تفكيك نسيج النبات. يمكن دراسة الخلية البكتيرية الخالية من الأنزيمات واستعمالها في هذا الغرض.

ب - مرض الشحوب المتبقع في الأقحوان

Chrysanthemum Chlorotic Mottle Disease

كان أول وصف لهذا المرض في أوائل الخمسينات وكان يعزى إلى مسبب فيروسي، استمرت الأبحاث عليه حتى سنة ١٩٧١ حيث أثبت Dimock et al أن هذا المرض يتسبب عن فيرويد وذكر أن أعراض الشحوب المتبقع التي تظهر في الأقحوان *Chrysanthemum morifolium* من المستبعد أن تتسبب عن إصابة فيروسية. وفي أبحاثه أثبت أن مسبب هذا المرض يشبه مسبب مرض الدرنه المغزلية في البطاطس ومسبب مرض تقزم الأقحوان.

الأعراض:

تظهر أوراق النباتات المصابة بلون أصفر شاحب يتخلله بقع متفاوتة في اللون الأخضر من الفاقح حتى الغامق. هذه الأعراض تكون المرحلة الأخيرة من الإصابة، أما في البداية فهو يشبه أعراض الموزايك المتسبب عن الفيروس، لذلك يحدث التباس في تشخيص هذا المرض وتمييزه عن الأمراض الفيروسية. قد تظهر الأعراض على عدة أوراق على النبات وقد تكون معظم الفروع مصابة. يضعف النبات وتتساقط الفروع القريبة من سطح التربة بعد أن تضعف. النباتات الشديدة الإصابة تظهر باللون الشاحب. كما سبق وذكرنا يكون هناك إلتباس في أعراض هذا المرض مع الأعراض الأخرى وخاصة الموزايك الفيروسي ونقص العناصر الغذائية في التربة، إلا أن التبرقش الأخضر على سطح الورقة المصفرة هو الذي يميز الإصابة بهذا الفيرويد عن بقية الأمراض الأخرى شكل ٦٦.

المسبب:

يتسبب هذا المرض (مرض الشحوب المتبقع في الأقحوان) عن فيرويد *Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid* ويكتب (ChCMVd). يبدو

أن هذا الفيرويد يختلف تماماً عن بقية الممرضات الأخرى فهو يصيب ويسبب الأعراض المرضية على نباتات الأقحوان فقط. للفيرويد المقدرة على أن يصيب النباتات التي تكون قد أصيبت مسبقاً بأي فيرويد آخر وليس عنده القدرة على الحفاظ أو الوقاية بالتضاد. لقد استعمل مع كثير من الفيرويدات فى تجارب الوقاية بالتضاد فلم يثبت بأن عمل وقاية للنبات من أى فيرويد متحدى آخر. من الصعب صيغ مستحضرات هذا الفيرويد بمادة Toluidine blue.

إن صفات هذا الفيرويد تختلف عن بقية الفيرويدات حيث أن المدى العائلى له منحصر فقط فى بعض أنواع الأقحوان مثل Deep Ridge ، Bonnie Jean ، Mistletoe. كذلك فإن إنتقال الفيرويد بالعصارة صعب. أما تتابع النيوكليوتيدات فى هذا الفيرويد ووضعه التصنيفى لم يتأكد بعد. يمكن أن تفقد حيوية الفيرويد بسرعة فى المستخلص وكذلك طريقة الاستخلاص تؤثر على حيوية الفيرويد حيث جداول ٣٩، ٤٠ تبين بعض صفات هذا الفيرويد.



شكل رقم ٦٦ :

أعراض الإصابة على أوراق نبات الأقحوان بالفيرويد ChCMV. الورقة e سليمة والورقة B تظهر أعراض الشحوب المتبرقش.

جدول ٣٩: تأثير رقم الحموضة على ثبات فيرويد ChCMVd في المستخلص الخام.

٪ حيوية المستخلص في درجة حموضة							عدد ساعات التحسين	المادة المخفلة للمستخلص تركيز ١،١ مول
١٠،٥	٩،٥	٨،٥	٧،٥	٦،٥	٦،٢	٥،٥		
—	—	—	٧٠	٢٠	—	صفر	صفر	Tris - moleate - HCl
—	—	—	٣٠	صفر	—	صفر	٢	
—	—	٨٠	٥٠	—	—	—	صفر	Tris - HCl
—	—	٩٠	٥٠	—	—	—	٢	
—	—	٩٠	١٠٠	—	—	—	صفر	Boric acid - NaOH
—	٩٠	١٠٠	—	—	—	—	٢	
٤٠	٩٠	—	—	—	—	—	صفر	Glycine - NaOH
٣٠	٧٠	—	—	—	—	—	٢	
٦٠	—	—	—	—	—	—	صفر	NaCO ₃
صفر	—	—	—	—	—	—	٢	
—	—	—	—	—	صفر	—	صفر	water
—	—	—	—	—	صفر	—	٢	

ملاحظات:

كان يستعمل إخبار الحيوية مباشرة بعد التحضير وثانية بعد التحسين لمدة ٢ ساعة على درجة حرارة الغرفة العادية. كان يستخلص من النسيج في Specified diluent (١٠ مل / غرام) ويضبط رقم الحموضة باستعمال ٢ نظامي من ميثروكسيد الصوديوم و ٢ نظامي حمض HCl.

جدول ٤٠ : حيوية وثبات الفيروس بعد طرق الاستخلاص المختلفة.

طريقة الاستخلاص	% الحيوية					
	تخفيض المستخلص			عدد أيام التخزين على درجة ٤م		
	صفر	١٠-١	١٠-١	صفر	١	٣ ٧ ٢٨
Borate buffer	٦٠	٤٠	صفر	٦٠	١٠٠	٤٠ ٣٠ صفر
Borate buffer + chloroform n - butanol	١٠٠	٤٠	صفر	٩٠	١٠٠	٨٠ ٧٠ ٧٠
Borate - SDS - buffer + Phenol	٦٠	٦٠	٢٠	٧٠	٩٠	٦٠ ٦٠ ٦٠
Borate - SDS - buffer + DEP	٤٠	صفر	صفر	٣٠	٢٠	٢٠ صفر -
water	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر صفر صفر

ملاحظات:

- ١ - كان يستخلص النسيج في ٠,٢ مول بيريك أسد - هيلروكسيد صوديوم، ٥ على مول كلوريد مغنسيوم حموضة (٩). (٢ ملتر / غرام) والمتجانس يتقى بالسرعة المنخفضة بألة الطرد عن المركز قبل الاحجار.
- ٢ - تختبر النباتات المريضة بعد ٣٠ يوم من الحقن وتحسب النسبة المئوية بين عدد النباتات المريضة والمحفونة.
- ٣ - بيئة الاستخلاص تحتوي كلوروفورم - n - بيوتانول (١ مل / غرام).
- ٤ - Borate buffer تحتوي ١ SDS.
- ٥ - كان يستعمل للماء بدلاً من اللظام في التجربة للتحكم.

٥ - فيرويدات حشيشة الدينار

Hop Viroids

١ - مرض تقزم حشيشة الدينار

Hop Stunt Disease

مقدمة عن نبات حشيشة الدينار:

قبل أن نتكلم عن الأمراض الفيرويدية الهامة والخاصة بنبات حشيشة الدينار وحيث أن هذا النبات لا يزرع في بلدان الشرق الأوسط، نود أن نعطي فكرة عن الوصف النباتي لهذا النبات.

يسمى نبات حشيشة الدينار باللغة العربية الفصحى (جنجل) واسمه العلمي *Humulus lupulus* ويتبع العائلة القنابية Fam. Cannabinaceae. والأصل في تسميته بهذا الاسم غير معروف ولكن يبدو أن كلمة *Humulus* مأخوذة من كلمة *Humus* ومعناها رطب وهي تشير إلى الأرض الرطبة التي ينمو فيها النبات. أما كلمة *Lupulus* معناها الذئب وتشير إلى صفة من صفات النبات حيث أنه يخفق العائل الذي يتسلق عليه مثل الذئب الذي يخفق فريسته.

لا يزرع نبات حشيشة الدينار في منطقة الشرق الأوسط ولكنه يزرع بكثرة في اليابان والجمهورية الفرنسية والولايات المتحدة الأمريكية وقد إنتشرت زراعته في أماكن متفرقة من العالم مثل أمريكا الجنوبية وأستراليا أما موطنه الأصلي فهو أوروبا وآسيا.

نبات حشيشة الدينار عشب معمر متسلق ويلزم له دعائم أو سدادات في الحقل ليستند عليها، يعيش في الأرض من ١٠ - ١٥ سنة ويصل ارتفاعه إلى عشرة أمتار له أوراق بيضاوية الشكل ويحمل النبات أزهاراً مؤنثة وأخرى مذكرة لونها أصفر مخضر قليلاً وتوجد الأزهار في نورات شبه مخروطية شكل ٦٧. الأزهار المؤنثة أكبر حجماً من الأزهار المذكرة. يوجد في قواعد الأزهار قنابات ويوجد على قواعد هذه القنابات غدد تحتوى على الزيت الطيار العطري وهذه الزيوت هي التي تعطى النورة رائحتها وطعمها المميز لحشيشة الدينار. تستعمل المخاريط الثمرية الأنثوية في العمليات الصناعية حيث هي التي تحتوى شعيرات غزيرة توجد فيها المكونات الفعلية المستفاد منها.

تتكاثر حشيشة الدينار إما بالبذور أو بالعقلة وتفضل الطريقة الأخيرة وهي المنتشرة في أوروبا وأمريكا لسهولة انتشارها حيث تزرع العقل في مشاتل ثم بعد التجذير تنقل إلى الأرض الدائمة. تجتمع المخاريط الزهرية في شهر سبتمبر من كل عام ابتداءً من العام الثالث، عندما يتم نضجها ويتم الجمع في الصباح الباكر وتنقل إلى حجرة التجفيف الصناعي مباشرة حتى لا يتغير لونها. يعطى الهكتار الواحد حوالي ١٢ - ٢٢ طن من الثمار المخروطية في الجمعة الواحدة. يستمر النبات يعطى إنتاج لمدة عشرة سنوات.

تستعمل حشيشة الدينار أساساً في صناعة البيرة حيث تكسبها الطعم المرو هو مرغوب في صناعة البيرة. كذلك فإن لحشيشة الدينار قيمة حافظة لوجود مواد رائتجية فيها. كذلك فإن حشيشة الدينار عندها قدرة على تكوين رغوة Froth وذلك للأحماض والمواد الراتنجية الموجودة فيها. أما زيت بذرة حشيشة الدينار فهو منوم ومسكن خفيف ويستعمل لتهلئة الأعصاب.



شكل رقم ٦٧ :

يبين شكل الورقة والخروط في حشيشة الدينار.

أهم مكونات حشيشة الدينار هو الزيت الطيار الموجود في غدد زيتية وشعيرات غدية في النورة المخروطية بنسبة تتراوح من ٠,٣ - ١ ٪ ويستخلص الزيت بواسطة عملية التقطير وله رائحة نفاذه وطعم مر ويحتوى على مادة Humulene وهو يتبع مجموعة Sesquiterpenes. بالإضافة إلى الزيت الطيار تحتوى المخاريط الزهرية مواد راتنجية منها Humulone ومادة Lupulone ويرجع إليها الطعم المر الداخلى فى صناعة البيرة. كذلك يوجد حمض Lupulinic ومواد تنبيهه Humulo وكذلك كحول Geraniol.

مرض تقزم حشيشة الدينار:

كان أول وصف لهذا المرض بواسطة العالم Yamamoto et al سنة ١٩٧٠ فى اليابان وذكر أن النباتات المريضة تكون ذات عقل قصيرة خاصة فى الساق الرئيسى والفروع الجانبية وتتجدد الأوراق العليا وتلتف إلى الجهة السفلية ويصغر حجم نصل الورقة وتصفّر الأوراق وتسقط أحياناً، تتقزم النباتات. بعد ذلك كثير من الباحثين وصف المرض. إن هذا المرض قد نال قسماً وافياً من الأبحاث مثل مرض الدرنه المغزلية فى البطاطس ومرض تقزم الأقحوان وهو لا يقل عنهما شأنًا من الناحية العلمية.

إصابة نباتات حشيشة الدينار بفيرويد تقزم حشيشة الدينار يؤدي إلى خفض في معدل النمو ولكنه لا يؤثر على معدل تكوين وخروج الأوراق ولا على إختفاء التركيب شبه المطوى الذى يغطى خلايا الايدرمز. المخاريط الناجمة والمأخوذة من النباتات المصابة تكون صغيرة الحجم محتوياتها من الأحماض الالفاتية منخفضة إلى النصف أو الثلث بالمقارنة مع النباتات السليمة. كذلك فإن الغدد (اللوبيولين Lupulin) تكون موزعة وأكثر إنتشاراً على القنبيات وعلى الأغلفة الزهرية وينخفض عدد هذه الغدد بنسبة تصل ٦٠٪ مقارنة مع النباتات السليمة. بالفحص والتصوير بالميكروسكوب الالكتروني تبين أن معظم الغدد اللوبيولينية الموجودة على أغلفة المخروط من النباتات المصابة تنكمش كثيراً وتبدل. أما الحبيبات الكروية (١,٢ - ١,٩ مليمكرون) لم تلاحظ على سطح هذه الغدد فى المخاريط المصابة.

أما خلايا الغدد الراتنجية فى المخاريط المصابة جهازياً، عند الفحص الدقيق لها وجد أنها تختلف فى نقطتين أساسيتين الأولى: الخلايا المصابة تكون ذات جدر خلوية مشوهة. الثانية: يظهر نقص كبير فى المواد Electron dens substance، وقد إكتشف أن هذه المواد تكون على شكل أملاح غير ذائبة والتي تكون مساوية لجزيئات الأحماض الالفاتية من المواد الراتنجية المفرزة بواسطة الغدد الراتنجية.

عند فحص القمم المرستيمية من نباتات حشيشة الدينار المصابة بفيرويد التقزم للملاحظة التغيرات السيتوبلازمية لم يلاحظ أى تغيرات فى قمة الفرع لغاية طول ٠,٢ ملم (هذه المنطقة تحمل القمة المرستيمية وزوجان من بداية الأوراق) ولكن فى خلايا الطبقة الثالثة من الأوراق المحيطة بالقمة لوحظت جدر الخلايا غير منتظمة واسمك منها فى النباتات السليمة، هذه الاضطرابات فى جدر الخلية تزداد لغاية الطبقة الخامسة المحيطة من الأوراق بالقمة وتزداد بزيادة الإصابة. كذلك بالإضافة لتشوة الجدر الخلوية يظهر عدم تعضى فى البلاستيدات الخضراء. أما أجسام Paramural فلم يطرأ عليها تغيير نتيجة الإصابة. أما جدر النواة والميتوكوندريا

والرايبوسومات وجهاز الغشاء السيتوبلازمي لم يحدث عليهما تغيرات نتيجة الإصابة الفيرويدية. كما وجد بأن الإصابة الفيرويدية تسبب نقصاً في التجذير ويكون هناك إضطرابات في المحتوى الهرموني في النبات وخاصة هرمون أندول أستك أسد والسيتوكاينين.

مسبب المرض:

يتسبب مرض تقزم حشيشة الدينار عن فيروس تقزم حشيشة الدينار (HSVd) Hop Stunt Viroid هذا الفيروس يتكون من ٢٩٧ نيوكليتيده متتابعة وقد يصل التابع في بعض السلالات إلى ٣٠٣ نيوكليتيده. للفيروس صفات مرضية وصفات كيميائية مشابهة لفيروس الثمرة الباهتة في الخيار CPFDV ولكنه يختلف عن صفات فيروس الدرة المغزلية في البطاطس PSTVd. للفيروس HSVd كفاءة ترسيب منخفضة، كذلك فإنه لا يشبط بالفينول أو الكلوروفوم، ويستخلص بالفينول وترسب بالايثانول. درجة حرارة التثبيت للفيروس ٨٤م لمدة عشرة دقائق. أما درجة التخفيف القصوى في العصارة ١ : ٢٥٠٠. كما أن الفيروس يفقد حيويته في تخفيف ١ : ١٠٠٠٠ إذا حفظ يوم واحد على درجة حرارة ٢٠م ولكن ليس أكثر من ثلاثة أيام على درجة ٤م. عندما تترك أجزاء النبات والأوراق والمخاريط لتجف بالشمس فإن حيوية الفيروس تفقد كلية خلال ٣ شهور.

طول الفيروس إذا كان في الشكل المستقيم شبه العصوي ٨٠ نانوميتر. وزنه الجزيئي ١٠٠٠٠٠ دالتون. لا ينتقل الفيروس خلال حبوب اللقاح ولا البويضات. يمكن أن يبقى الفيروس حياً في الجهاز الجذري لنباتات حشيشة الدينار خلال شهور الشتاء. ينتقل الفيروس ميكانيكياً وتكون النتيجة أفضل عندما يتم الحقن في الأوراق الأولى حول القمة النامية. كما أنه ينتقل إلى نباتات الخيار Cucumis sati vum. تظهر الأعراض النموذجية بعد ١٤ - ١٦ يوم من الحقن. درجات الحرارة أعلى من ٣٠م تلامس تكشف الأعراض الخارجية. درجة الحموضة المثلى لاستخلاص الفيروس ٨ - ٩,٥ pH وأفضل طريقة فصل (استخلاص) تكون بمنظف High salt alkaline.

عند إجراء عملية فهرسة للنباتات المصابة بالفيروس، يلاحظ أن النباتات المصابة بالفيروس HSVd لا يلاحظ عليها أعراض في السنة الأولى من حيث المظاهر الخارجية ولا النقص في محتوى الأحماض الليفاتية. أما في السنة الثانية يمكن ملاحظة هذه الأعراض.

ولقد ذكر أن الفيروس يكون موجوداً في أجزاء النواة في خلايا العائل المصاب ويكون تناسخه في النواة. يكون الفيروس HSVd كما في بقية الفيروسات موجودة على شكلين الأول شكل مستقيم والثاني دائري وإن كلا الشكلين يكون معدياً ويسبب مرض تقزم حشيشة الدنار.

كما وجد بأن cDNAs ثنائي الخيط المحتوى من ١ إلى ٣ وحدات طول متتابعة من HSVd يكون معدى، وأن نباتات الخيار المحقونة بهذا التركيب تكون أعراضها غير مميزة عن أعراض الإصابة بفيروس HSVd كما في جدول رقم ٤١.

جدول ٤١: الاختبارات الحيوية للفيروس HSVd والأجزاء من ds-cDNA المحتوية أكثر من وحدة طول من RNA الخاص بالفيروس، على نباتات الخيار الكاشفة.

الأحماض النووية في التجربة	التركيز ميكروغرام / ملتر	% حيوية الفيروس بعد		
		٢٠ يوم	٢٨ يوم	٣٥ يوم
Bam H 1 - 1 unit	٢	١٧	٣٤	٣٤
	٠,٤	صفر	صفر	صفر
Bam H 1 - 2 unit	٢	١٠٠	١٠٠	١٠٠
	٠,٤	٤٠	٤٠	٦٠
Bam H 2 - 3 unit	١,٥	صفر	٨٠	١٠٠
	٠,٣	١٦	٧٢	٩٣
HSVd RNA	٠,٥	٢٥	١٠٠	١٠٠
	٠,١	٥٠	١٠٠	١٠٠
كترول - ماء	صفر	صفر	صفر	صفر

* كانت تحسب النسبة المئوية بحساب عدد النباتات المصابة على النباتات المحقونة.

كذلك فقد وجد أن التابع الضروري وجوده لكي يكون الحمض النووي معدى هو ٦٠ وحدة متتابعة مرتبة مرتين من الفيريود HSVd من منطقة A (كما يأتي في السلالات). إن منطقة A هي الحساسة ولها دور كبير في إحداث العدوى. إذا تكون تركيب لا يحوى الستين نيوكليتيده المتتابعة من منطقة A فلا يكون هذا التركيب معدى.

العوائل المشخصة:

يعتبر نبات الخيار أكثر العوائل حساسية للكشف عن فيريود HSVd. إن اختبار PAGE للخيار للكشف عن الفيريود يحتاج ٩ ساعات. أما إنتظار ظهور الأعراض على نبات الخيار فيحتاج ٣٠ يوماً.

من العوائل المشخصة الهامة والمعروفة للفيريود هي :-

- | | |
|---|----------------------------------|
| 1 - <i>Gynura aurantiaca</i> | 3 - <i>Bentincasa hispida</i> |
| 2 - <i>Lycopersicon esculentum</i> | 4 - <i>Cucumis sativus</i> |
| 5 - <i>C. melo</i> | 6 - <i>Lagenari siceraria</i> |
| 7 - <i>L. Siceraria</i> Var. <i>siceraria</i> | 8 - <i>L. S. Var. microcarpa</i> |
| 9 - <i>Phaseolus vulgaris</i> | 10 - <i>Helianthus annuus</i> |

تظهر أعراض الفيريود على نبات الخيار *C. sativus* على شكل تقزم، إبيضاض أو شفافية العروق، تجعد الورقة بعد ١٤ - ١٧ يوم من الحقن. كذلك فإن أعراض المرض تظهر على الخيار *C. melo* على شكل تقزم، تجعد الورقة وحدوث نكروزز في قمة الورقة بعد ١٦ - ٢٢ يوم من الحقن وتموت أحياناً النباتات المصابة بشدة. أما بالنسبة لنباتات الطماطم فتكون الأعراض غير ظاهرة ويكون تركيز الفيريود فيها منخفضاً عنه في نباتات الخيار. لا ينتقل الفيريود مع بذور الطماطم *L. esculentum*.

يكون تأثير وسلوك الفيروس HSVd والفيروس CPFD (الثمرة الباهتة في الخيار) في الجيل متماثلاً ويشابه 7S RNA المستخلص من النباتات السليمة.

ولقد ثبت في بعض التجارب التي أجريت في اليابان سنة ١٩٨٩ أن نبات الدخان *Nicotiana tabacum* يعتبر عائل لفيروس HSVd بعد أن بقي لعدة سنوات يقال بأن نباتات الدخان مقاومة للإصابة بالفيروس HSVd. وتمت هذه النتيجة بناءً على التجارب التي أدخل فيها HSVd - cDNA في نبات الدخان بواسطة بلازميد Ti واكتشف تناسخ الفيروس في نباتات الدخان المحولة وراثياً Transgenic. ولقد إختبرت قابلية الدخان للإصابة بالفيروس بطريقتين مختلفتين الأولى بالحقن عن طريق بكتيريا *Agrobacterium* والتي تسمى Agrobacterium inoculation. أما الطريقة الثانية فهي الطريقة الميكانيكية العادية. مع أن الطريقة الميكانيكية كانت تستعمل في التجارب السابقة، إلا أنها كانت تفشل في نقل الفيروس لنبات الدخان ويرجع سبب الفشل لعدم وجود التركيز الكاف من الفيروس وحيث أن الخطوة الأولى في الإصابة تكون بنشيت الفيروس وترجمته في السيتوبلازم، وبالتالي فإن عدم كفاءة النقل الميكانيكي في حقن الدخان يكون لعدم كفاءة نقل الفيروس من السيتوبلازم إلى النواة.

التخلص من الفيروس:

كما هو معروف فإن فيروس HSVd ينتقل ميكانيكياً وحيث أن هذا الفيروس يتأثر بكثير من المحاليل الكيميائية مثل ١٪ فورمالدهيد، ١٪ صوديوم هايپروكساييد، ٥٪ صوديوم هايپوكلوراييد ٥٪ ترأي صوديوم فسفيت، ٢٪ فورمالدهيد. كذلك يوصى باستعمال محلول ٥٪ كالسيوم هايپوكلورايت. كذلك فإن تسخين أنصال السكاكين الملوثة لمدة ١٠ دقائق على درجة حرارة ١٦٠°م كانت فعالة في التخلص من الفيروس. كذلك فإن تعريض الفيروس لدرجة حرارة ١٤٠°م تمنع إنتقال الفيروس.

يمكن منع النقل الميكانيكي عن طريق غمر مقصات التقليم وسكاكين

القطع والأدوات الزراعية المستعملة في الحقل لمدة عشرة دقائق في أى من المحاليل السابقة الذكر.

سلالات الفيرويد:

إن فيروس HSVd من الفيرويدات ذات السلالات الكثيرة وكل سلالة من هذه السلالات تستخلص من عائل نموذجي لها وتوضع أو تصنف السلالات المتقاربة جداً في زمرة معينة كما في جدول ٤٢ وشكل ٦٨.

جدول ٤٢: سلالات فيروس حشيشة النبقار وأماكن وجودها.

زمرة السلالة والعائل	اسم السلالة	منطقة إنتشار السلالة	عدد التيونكيتيدات	الاختلاف في التيونكيتيدات			٪ تماثل السلالات
				استبدال	حذف	حذف	
Hop Type	Hop Stunt Viroid	اليابان	—	—	—	—	—
Hop	HSVd - hop	اليابان	٢٩٧	—	—	—	١٠٠٪
Peach	HSVd - Peach (A9)	اليابان	٢٩٧	١	صفر	صفر	٩٩,٧
Grapevine	HSVd - Grapevine	الصين اليابان	٢٩٧	١	صفر	صفر	٩٩,٧
Plum Type	Hop - Plum Viroid	اليابان	—	—	—	—	—
Plum	HSVd - Plum	اليابان	٢٩٧	١٣	٣	٣	٩٣,٦
Peach	HSVd - Peach	اليابان	٢٩٧	١٣	٣	٣	٩٣,٦
Citrus Type	Hop - Citrus Viroid	اليابان	—	—	—	—	—
citrus	HSVd - Citrus - 1	اليابان	٣٠٢	٧	٧	٢	٩٦,٣
citrus	HSVd Citrus - 2	اليابان	٣٠٢	٧	٦	١	٩٧
cucumber	HSVd - cucumber	نذرلان	٣٠٣	٨	٧	١	٩٦,٣

* ينشر الفيرويد في كل من أمريكا - أستراليا - فرنسا - إسبانيا - هنغاريا.

لقد وجد أن الفيروسات المستخلصة من البرقوق Plum والخوخ Peach تكون متقاربة جداً مع فيروس HSVd على أساس الصفات المرضية التي تسببها على نباتات العائلة القرعية (الخيار) وإن طريقة التحليل بواسطة PAGE، التهجين الجزيئي، تماثل تتابع النيوكليوتيدات وأعراض هذه الفيروسات على نباتات الخيار صنف (Suyo) كانت تقريباً نفس الأعراض المتسببة عن فيروس HSVd المأخوذ من حشيشة الدينار والمأخوذ من العنب والمأخوذ من الخيار والمأخوذ من الحمضيات تحت نفس ظروف الصبوا الزجاجية. إن المدى العائلي للفيروس المأخوذ من DF - plum يشابه الفيروس المأخوذ من حشيشة الدينار والمأخوذ من الخيار. هناك فرق بسيط في المدى العائلي أمكن تمييزه على نباتات الطماطم، فقد ذكر أنه لغاية ١٩٩٠ فإن عزلة DF - plum لم يبدو أنها تصيب الطماطم ولكن الفيروسات HSVd المعزولة من حشيشة الدينار والعنب والخيار والحمضيات تصيب الطماطم بدون إحداث أعراض ظاهرة.

التهجين الجزيئي وتحليل التتابع أظهر أن كلا الفيروسين فيهما أكثر من ٧٩٠ تماثل تتابع مع عزلات HSVd. وبشكل خاص فإن عزلة A9 - peach - DF كانت تختلف بنيوكليوتيدة واحدة عن HSVd المعزول من حشيشة الدينار و ٢ نيوكليوتيدة فقط عن HSVd المعزول من العنب وبالتالي عرفت هذه الفيروسات على أنها سلالات خرج من HSVd و يشار إليها HSVd - peach. إن هذه العزلات الثلاثة متقاربة جداً مع بعضها البعض وتشكل زمرة واحدة تسمى زمرة حشيشة الدينار Hop type. ومن ناحية أخرى فإن سلالات DF - plum و DF - peach - AF لها نفس التتابع وهي بعيدة القرابة عن زمرة Hop type من مجموعة HSVd وهي أكثر قرابة وصلة مع عزلات HSVd من العنب الألماني. وإن هذه العزلة الأخيرة تختلف في ثمانية مواقع عن الفيروس المعزول من حشيشة الدينار HSVd - hop وأن سبعة من هذه الثمانية هي نفس النيوكليوتيدات في DF - peach AF مع أن DF

AF - peach تختلف بزيادة ١٢ موقع عن HSVd - hop، العزلة تكون نموذجية كما في سلالة HSVd المأخوذة من البرقوق plum ويشار إليها HSVd - plum أو [AF - peach - HSVd] إن HSVd - plum و HSVd grapevine يبدو أنها تشكل زمرة البرقوق وتكتب plum type من مجموعة HSVd.

زيادة على ذلك فإن العزلات المأخوذة من الخيار والحمضيات المذكورة سابقاً متقاربة جداً مع بعضها البعض وتشكل زمرة الحمضيات Citrus type من مجموعة فيروسات HSVd.

في السنوات الأخيرة تم اكتشاف عزلات من HSVd من أنواع مختلفة من النباتات في كثير من أقطار العالم ويمكن تصنيفها إلى ثلاثة زمر كما ذكر سابقاً وهذه الزمر الثلاثة هي زمرة حشيشة الدينار Hop type وزمرة البرقوق Plum type وزمرة الحمضيات Citrus type.

إن التحليل المقارن لتتابع نيوكليوتيدات هذه الزمر يظهر وجود منطقة محفوظة ومنطقة متغيرة في جزئ HSVd. الجزء العلوى من المنطقة المركزية المحفوظة (ذات القواعد من ٦٠ - ١١٤ في السلالة المأخوذة من حشيشة الدينار HSVd - hop) نهاية اليد اليسرى ٢٦٧ إلى ٢٤ في HSVd - hop، والجزء من اليد اليمنى من جزئ HSVd محفوظ (شكل ٦٨).

إن أهمية الجزء العلوى من المنطقة المركزية المحفوظة (على الشكل Region A) يكون في تناسخ الفيروس HSVd. إن المنطقة المركزية المحفوظة في الجزء العلوى الملاحظة في العزلات الطبيعية من HSVd متوافقة دائماً مع منطقة A في الشكل والذى من المعتقد أنه يتضمن وصل الأزواج المستعملة في تكاثر الفيروس. بالإضافة إلى ذلك فإن الجزئين الأخيرين المشار إليهما سابقاً هي أيضاً ستكون مهمة في تكاثر فيروس HSVd، بسبب ثلاثة طافرات محدثة في هذا الجزء عن طريق إحداث

طفرات في المعمل والتي تجعل HSVd غير معدى. من ناحية أخرى فإن هناك مناطق مختلفة موجودة على جانبي المنطقة المركزية المحفوظة. إن الموقع الموجود عليه واحد منها في الجهة اليسرى متوافق مع منطقة تغيير المرضية في فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس وفيروس اكسوكورتز الحمضيات مع أن جميع عزلات HSVd تحدث أعراضاً متشابهة على نباتات الخيار.

بالاعتماد على نتائج حقن العصارة والتحليل بواسطة PAGE يبدو أكثر احتمالاً بأن HSVd - plum يسبب مرض تنقر الثمرة على البرقوق صنف Taiyo. بالإضافة لذلك، على نبات الخوخ فإن HSVd - peach (AF) والذي هو مرادف للاسم HSVd - plum أو A9 - HSVd - peach يبدو أنها مترافقة مع أعراض تنقر الثمرة. إن هاتين العزلتين لهما تتابع نيوكليوتيدات مختلف. إن HSVd - peach (AF) المعزول من الخوخ والتي تظهر أعراض تنقر الثمرة الشديدة لها نفس تتابع النيوكليوتيدات كما في HSVd - plum المأخوذة من الأعراض النموذجية لتنقر الثمرة في البرقوق، ولكن HSVd - peach (A9) المعزولة من الخوخ المظهرة أعراض تنقر الثمرة البسيطة لها تتابع نيوكليوتيدات مختلف.

نظراً لأن فيروس HSVd المكتشف في نباتات حشيشة الدينار اليابانية، فيه مجموعة مماثلة من هذه العوامل تسمى HSVd - group، قد تبين بأنها منتشرة بين أنواع عديدة من أشجار الفاكهة مثل العنب، الحمضيات، الخوخ والبرقوق، فإن بعضاً من هذه السلالات من فيروس HSVd تسبب أمراضاً خطيرة على ال hop، الخيار، البرقوق وأحياناً الخوخ ولكنها تصيب العنب والحمضيات ومن المحتمل أن يكون لهذه النباتات (العنب والحمضيات تفاعل معين مع هذا الفيروس HSVd).



شكل رقم ٦٨ :

A: مقارنة بين تتابع النيوكليوتيدات في DF - peach A9 و DF - peach AF و DF - plum إلى مجموعة HSVd. النيوكليوتيدات المختلفة عن تلك التي في HSVd يشار إليها بأشهر.

B: المناطق المحفوظة والمتغيرة في جزيء HSVd (D) تدل على المواقع حيث التغير في تتابع النيوكليوتيدة قد تميز بين السلالات. (□) تدل على نهايات التتابع المشترك لفيريود HSVd مع تلك في فيريود PSVd. (♦) تدل على مواقع الطفرات التي تحمل HSVd غير معدى عن طريق استعمال تكتيك الطافرات في العمل. C - Region تمثل المناطق المحفوظة. يلاحظ منطقة A الهامة في تركيب الفيريود.

ب - الفيرويد الكامن في حشيشة الدينار

Hop Latent Viroid

كان أول ذكر لمرض غير معروف المسبب يظهر على نباتات حشيشة الدينار في اليابان سنة ١٩٧٧ بواسطة كل من Sasaki & Shikata وذكر هذان العالمان أن هناك بعض الخفض في إنتاجية حشيشة الدينار ويوجد بعض الاضطرابات التركيبية في المحتويات من الأحماض والراتنج الموجود في النباتات المصابة، إلا أنهم لم يذكروا مسبب هذا المرض.

في سنة ١٩٨٠ ظهرت خسائر واضحة في جميع زراعات حشيشة الدينار، وبالرغم من أن الخسائر الاقتصادية كانت واضحة في الانتاج، إلا أن مسبب المرض لم يحدد لأنه لا يوجد أعراض ظاهرة خارجية يمكن تمييزها على النبات وكانت الخسائر تقدر بدون الاعتماد على اسم المرض.

في سنة ١٩٨٧ ذكر في أسبانيا أن فيرويد وجد بالمصادفة أثناء الكشف عن فيرويد تقزم حشيشة الدينار، يرافق زراعات حشيشة الدينار وهو مميز عن فيرويد تقزم حشيشة الدينار، وقد اعتقد الباحثون أن هذا الفيرويد له علاقة مع بعض المظاهر المرضية في هذا النبات. في سنة ١٩٨٨ كان أول وصف علمي لهذا الفيرويد في اليابان وذلك من قبل كل من Puchta و Ramm & Sanger وهذا الوصف مذكور في مجلة Nucleic acid Res. العدد ١٦ صفحة ٤١٩٧ - ٤٢١٦.

سمى الفيرويد باسم الفيرويد الكامن في حشيشة الدينار Hop Latent Viroid ويكتب HLVD. ينتشر هذا الفيرويد في بريطانيا، اليابان، نذرلاند وأسبانيا.

الأعراض غير المنظورة:

ينتشر هذا الفيرويد في معظم زراعات حشيشة الدينار في العالم. يوجد في النبات بدون إظهار أعراض مرئية، إلا أن هناك خسائر تعتبر أعراض غير مرئية تلاحظ في

النباتات المصابة. يكون إنتاج المغاريط فى النباتات المصابة أقل منه فى النباتات غير المصابة. كذلك فإن وزن المخروط يقل فى النباتات المصابة بنسبة ٨٪ عنه فى النباتات السليمة، وبالتالي فإن الانتاج الكلى ينخفض ويصل خفض الإنتاج حوالى ٣٥٪. كذلك تنخفض نسبة الأحماض الأليفاتية فى النباتات المصابة بنسبة ٣٠٪ عنها فى غير المصابة، فى بعض الأصناف يكون الخفض ١٥٪ فقط. أما أحماض بتا والتي هى beta - acids ترتفع فى النباتات المصابة بالفيرويد عنها فى النباتات السليمة. تنضج المغاريط فى النباتات المصابة قبل النباتات السليمة.

هناك بعض الملاحظات المرئية قد تعتبر أعراض نتيجة الإصابة بالفيرويد، من هذه الملاحظات تكون النباتات غير المصابة ذات لون أخضر هذا الخضار أشد منه فى النباتات المصابة والمجاورة وتكون هذه النباتات أكثر قوة More Vigorous بحيث أنها تصل بسهولة إلى الأسلاك الموجودة فى قمم السدادات (النباتات متسلق ويصل النوع فى بريطانيا إلى طول خمسة أمتار ويعتمد على سدادات) وتعطى نموات طرفية غزيرة. كذلك فإنه قبل موسم الجمع فى سبتمبر يكون التمييز بين النباتات المصابة وغير المصابة غير لافتاً للنظر من حيث قوة النبات. النباتات المصابة تسمى النباتات غير القوية non - Vigorous. وثبت بالتجربة أن جميع النباتات غير القوية non - Vigorous مصابة بالفيرويد أما النباتات القوية تتراوح نسبة وجود الفيرويد فيها من ٥٪ - ١٥٪ ويلاحظ فى جدول ٤٣ تأثير الإصابة على كثير من محتويات المغاريط.

جدول ٤٣: إنتاج ومحتات المغاريط للوعى Omega من خشبة النبتار مصاب بالفيرويد H.L.V. وأخرى غير مصابة.

حالة النباتات	إنتاج المغاريط بالغرام / طارخ	محتات المغاريط عند البقاء	القيمة الوسطية	الأملاح الأليفاتية	الأملاح بتا	كروسيبين فى الأملاح فى ١٪	كروسيبين فى الأملاح فى ١٪	الزيت مليون / وزن	مليون / الزيت
مصاب	١٤٢٠	١٠٣	٧,٠٩	٦,٧٥	٣,٨	٣٣,٨٧	٥١,٠٧	٠,٧٨	١٩,٥٤
سليم	٢٢٦٦	١٥٦	٩,٣٥	٩,٧٢	٢,٩٣	٢٠,٦٥	٥١,٧٣	٠,٦٨	١٢,٥٧

الفيريود:

اسم الفيريود Hop Latent Viroid (HLVd). يتكون الفيريود من تتابع ٢٥٦ نيوكليوتيدة. له عائلتين فقط هما *Humulus lupulus* و *H. japonicus*. يمكن اكتشاف الفيريود في بقايا النبات بعد أن تكون جميع الأجزاء الهوائية قد ماتت في الشتاء وذلك باستعمال طريقة Dot - blot hybridization. من السهل كذلك اكتشاف الفيريود في نسيج الأجزاء الهوائية في منتصف الموسم الثاني للنمو ومن الصعب اكتشافه مبكراً في بداية موسم النمو. يمكن اكتشاف الفيريود أيضاً بسهولة بين بداية الموسم ومنتصفه ويمكن كذلك اكتشاف الفيريود في قواعد السيقان الجديدة ثم بعد ذلك ينتشر كلما تقدمت النباتات في النمو ويصبح قابل للاكتشاف عندما يصل قريباً من القمة النامية من السيقان في منتصف الموسم، تقريباً في الوقت الذي تكون فيه معظم استطالات النمو انتهت وبدأ الأزهار. تكون أعناق الأوراق أكثر الأنسجة كفاءة للإختبار ولإثبات وجود الفيريود، وذلك لسهولة جمعها ولكبر نصل الورقة وقلة وجود المثبطات بها. إن التهجين في Dot - blot أو في الموقع قد فشلا في اكتشاف الفيريود HLVd في قمم الأفرع من النباتات النامية على درجات حرارة منخفضة ١٠م و ١٥م. ولذلك فإن هناك فشل في إنتاج نباتات خالية من الفيريود في مزارع القمة المرستيمية في المعمل. هذا يؤدي إلى القول بأن هذه الأجزاء تحتوي فيرويد HLVd ولكن بمستوى منخفض جداً بحيث لا يمكن اكتشافه بأي من الطريقتين.

إن هذا الفيريود ينتشر بشكل كبير جداً في بريطانيا بحيث أن جميع زراعات حشيشة الدينار تقريباً تصاب به. لقد أجرى إختبار لوجود الفيريود HLVd بطريقة Nucleic acid hybridization باستعمال ٤٧٦ عينة مأخوذة من زراعات تجارية وإن هذه العينات تمثل نصف إنتاج حشيشة الدينار في بريطانيا، لقد أمكن اكتشاف الفيريود في ١٧٪ من العينات وتتراوح نسبة الإصابة في العينات من صفر٪ إلى ٨٩٪.

لقد وجد أن هذا الفيرويد موجود في جميع الأصناف الحساسة لفطر الذبول *Verticillium* باستثناء صنف واحد اسمه Sunshine وهو صنف قديم ينمو في مزرعة واحدة في بريطانيا. كما وجد أن هناك صنفان أقل تحملاً لفطر الذبول، إلا أن الإصابة الفيرويدية فيهما بكمية أقل. ولكن الأصناف التجارية الهامة المتحملة للذبول كلها تكون غير مصابة بالفيرويد HLVd. جدول ٤٤ يبين الأصناف الحساسة لفطر الذبول ونسبة الإصابة الفيرويدية فيها.

ينتقل الفيرويد ميكانيكياً بالحقن بالعصارة وله شكلان دائري ومستقيم وإن تتبع النيوكلييتيدات ٢٥٦ تترتب في تركيب ثانوي، وفيه منطقة مركزية محفوظة مثل بقية الفيرويدات ولكن ليس فيه ما يسمى Viroid - specif oligo A في الجزء الأيمن العلوى في شكل الجزئ شبه العصى.

جدول ٤٤: الإصابة الفيرويدية في مخاريط حشيشة الدنار المأخوذة من أصناف حساسة للذبول الفيرتسليم وغير حساسة. يلاحظ أن الجدول قسمين يمينى ويسارى.

الصنف (حساس) غير متحمل للذبول	عدد النباتات المصابة	عدد النباتات السليمة	% إصابة	% سليمة	عدد النباتات المصابة	عدد النباتات السليمة	الصنف (حساس) غير متحمل للذبول
Ruggle	٧٩	٧	٩	١٢	١	٨	Bramling cross
Goldings	٤٦	٢٠	٤٣	٨	١	١٢	Progress
Omega	٢٨	٢٥	٨٩	صفر	صفر	١٦	WGV
Sunshine	١	صفر	صفر	صفر	صفر	٨٢	Wye Target
wye challenger	٧٨	١١	١٤	صفر	صفر	٤٥	Yeoman
wye North down	٧١	١١	١٥	٥٠	١	٢	EMY
Zenith	٨	٥	٦٢				

٦ - فيروسات الطماطم

Tomato Viroids

١ - مرض النبات الذكري في الطماطم

Tomato Planta Macho Disease

مقدمة :

كان أول وصف لهذا المرض في المكسيك سنة ١٩٧٤ وذلك بواسطة Belalcazar & Galindo. ونتيجة أبحاثهما المستمرة على هذا المرض ذكرا أنه يتسبب عن عامل معدى سهل الانتقال ميكانيكياً ويصعب إنتقاله بالوسائل الأخرى. إن هذا المرض ينتشر في الحقل عن طريق احتكاك المجموع الخضري للنباتات المريضة مع المجموع الخضري للنباتات السليمة وبالأيدى والأدوات الزراعية الملوثة. أجريت تجارب عديدة لمعرفة المسبب ومن هذه التجارب معاملة العصارة المستخلصة من النباتات المريضة بطرق الكشف والتحليل المختلفة، تبين أن هناك أجزاء صغيرة جداً ومعدية موجودة في مستخلص الأوراق المريضة وبناءً على هذه النتائج إعتبر المرض بأنه يتسبب عن فيروس. باستمرار الأبحاث أحاطت الشكوك بهذه النتائج مما حدى بالعالم Galindo ومرافقه أن يستمرا في البحث وخاصة باتجاه الفيروس لأن علم الفيروسات كان قد نشأ علماً شاباً يافعاً وبدأت الأبحاث تتسابق إليه. وهكذا استطاع الباحثان أن يثبتا بأن الأجزاء المعدية ليست فيروس وذلك بالاعتماد على الميكروسكوب الإلكتروني والآلات المبعثرة للضوء وغيرها. وعندما حضرا حمض نووي من الحزم المبعثرة للضوء وإجراء فصل للأحماض النووية Fractionated

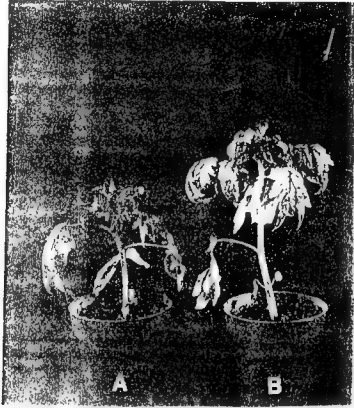
وذلك بالمعاملة بكلوريد الليثيوم وجدا أن هناك جزئ عال الشدة في العدوى في محلول كلوريد الليثيوم LiCl - soluble fraction وإفترضنا أن هذه الأجزاء ليست فيروس وذلك بسبب أن الأحماض النووية فيها كانت ذات وزن جزيئي منخفض نسبياً. لقد تأكد العالمان أن المسبب فيروس وليس فيروس وقررا أن مرض النبات الذكري في الطماطم Tomato Planta Macho Disease يتسبب عن فيروس وليس عن فيروس. كذلك فإن المسبب الفيرويدي لهذا المرض يمكن تأكيده على أساس الأعراض التي تظهر على العائل والتي تشبه تلك الأعراض المتكونة على الطماطم المصابة بمرض Tomato Bunchy Top Disease، وكذلك يشبه الأعراض المتكونة على الطماطم نتيجة الإصابة بفيروس الدرة المغزلية في البطاطس وكذلك يشبه الأعراض المتسببة على الطماطم من الإصابة بفيروس أكسوكورتز الحمضيات وبالتالي تأكد أن مرض النبات الذكري في الطماطم يتسبب عن فيروس.

الأعراض:

عرف هذا المرض في المكسيك وهو يهاجم الطماطم *Lycopersicon esculentum* المزروعة في جميع ولايات المكسيك وخاصة في منطقة Cuahutla المشهورة بزراعة الطماطم وخاصة للتصدير. يعرف المرض في تلك المنطقة باللهجة المحلية باسم (Planta Macho) يعنى النبات الذكر وذلك بسبب أن النباتات التي تصاب بالمرض لا تنتج ثمار تسوق، في بعض السنوات يسبب المرض خسائر كبيرة وأحياناً يسبب فقد كامل في المحصول.

النباتات المصابة تعاني من التقزم الشديد وتبدل الأوراق والوريقات ويأخذ النبات المظهر المتهدل وكأنه مرشوش بمبيدات الحشائش عريضة الأوراق أو كأنه يعاني من العطش الشديد (شكل ٦٩). الأوراق المتقدمة في السن تأخذ اللون الأصفر ثم تجف وتسقط، تصبح أنصال الوريقات متجددة وهشة وسريعة الانكسار. تحت الظروف المثلى المناسبة للمرض يمكن أن يتكشف نكروزز في عروق الأوراق والساق.

أهم مظهر يميز هذا المرض هو أن النباتات المصابة تنتج كثيراً من الأزهار والشمار أكثر من النباتات السليمة، إلا أن هذه الشمار تبقى صغيرة جداً لا يزيد حجمها عن حجم البلية (marlbes) وليس لها أية قيمة تسويقية أو إقتصادية.



شكل رقم ٦٩ :

أعراض الإصابة بمرض فيروس النبات الذكري في الطماطم على المجموع الخضري.

B: أعراض متوسطة

A: أعراض شديدة

المسبب :

يتسبب مرض النبات الذكري في الطماطم عن فيروس اسمه فيروس النبات الذكري في الطماطم Tomato Planta Macho Viroid. ويكتب باختصار (TPMVd). يتكون هذا الفيروس من ٣٦٠ نيوكليتيده. عند تحضير معلقات لمستخلصات النباتات المصابة بالمرض وحقنها في البادرات السليمة، تبين أن

الأعراض تبدأ في الظهور بعد ٢١ يوم من الحقن وتزداد أكثر ابتداءً من ٢٦ يوم بعد الحقن. ولقد وجد أن هذا الفيرويد إذا حضن مع RNase يفقد حيويته نهائياً أما إذا حضن مع DNase فلا يتأثر بذلك (مثل بقية الفيرويدات) ولقد وجد أن سرعته في الهجرة الكهربائية مشابهة لسرعة فيرويد PSTVd، واعتماداً على هذه الصفة برز سؤال أمام جميع العاملين على هذا الفيرويد هو هل هذا الفيرويد سلالة من سلالات PSTVd أم لا؟ عندئذ إلتجعت الأبحاث لتحديد العلاقة بين فيرويد النبات الذكر في الطماطم TPMVd وفيرويد الدرنه المغزلية في البطاطس PSTVd. وباستعمال الطرق الحيوية وطرق التحليل الكيميائية مثل Finger prints تبين أن فيرويد TPMVd هو فيرويد منفصل وليس سلالة شديدة كما كان يقال من سلالات PSTVd وذلك اعتماداً على:-

١ - لقد تبين أن هناك أنواعاً كثيرة من النباتات مقاومة للإصابة بفيريود TPMVd ولكنها قابلة للإصابة بالفيريود PSTVd.

٢ - هناك أنواع من النباتات العائل يستطيع الفيرويدان أن يتكاثرا فيها ولكن PSTVd يحدث أعراض في هذه العوائل في حين أن TPMVd لا يسبب فيها ظهور أية أعراض.

٣ - وجد أن هناك أنواع نباتية مشخصة أخرى لهذا الفيرويد TPMVd منها نبات *Gynura aurantica*. فمن المعروف أن فيرويد PSTVd وفيرويد اكسوكورتر الحمضيات CEVd يصيبان هذا النبات ويتكاثران فيه (تناسخ) وتظهر عليه أعراض مميزة، ولكن هذا النبات عند حقنه بالفيريود TPMVd فإن هذا الفيرويد يتناسخ في النبات (يتكاثر) وذلك بعد ٣ أسابيع من الحقن، ولكن هذا النبات لا يظهر عليه أعراض إصابة بالفيريود TPMVd ويبقى Symptomless.

٤ - كذلك فإن الفيرويد TPMVd والفيريود PSTVd تتشارك في كثير من العوائل ولكنهما يختلفان إختلافاً معنوياً في تفاعلها مع هذه العوائل من

حيث القابلية للإصابة والتعبيرات المرضية. فوجد أن كل من *Gomphrena* ، *Nicotiana - tabacum* و *Datura stramonium* ، *globosa* هذه الثلاثة عوائل مناسبة للفيرويد ويتكاثر فيها (بتناسخ) ولكنها لا تدعم الفيرويد TPMVd وتساعد على التناسخ (التكاثر) أما العوائل :

1 - *Nicotiana glutinosa*

2 - *Solanum melongena*

3 - *Solanum tuberosum*

هي عوائل للفيرويديين ولكنها تصاب فقط بفيرويد الدرنه المغزلية PSTVd وتظهر عليها أعراض مرضية ولا يظهر عليها أعراض مرضية إذا أصيبت بالفيرويد TPMVd .

هذه المميزات أكدت للباحثين أن فيرويد TPMVd هو فيرويد منفصل وليس سلالة شديدة من سلالات فيرويد الدرنه المغزلية في البطاطس PSTVd .

إنتشار الفيرويد TPMVd في النباتات المصابة :

إن جدول ٤٥ يبين أن الفيرويد TPMVd أمكن اكتشافه في جميع أجزاء نباتات الطماطم المصابة. أما الأوراق الناضجة التي لم يظهر عليها أعراض وجدت باستمرار تحتوي كميات أقل مما هو موجود في الأوراق الصغيرة المظهرة للأعراض. وجدت أكبر كمية من الفيرويد TPMVd في السيقان والجذور. أما جدول ٤٦ يبين أن الفيرويد متواجد في جميع الأجزاء تحت الخلوية في النبات باستثناء ال *Postribosomal* ووجد أن خلايا الورقة فيها مستويات عالية من الفيرويد موجودة في أجزاء من الأنوية. أما في خلايا الساق فإنه يوجد نسبة بسيطة من الفيرويد مرافقة للنوية. معظم الفيرويد متواجد في الميتوكوندريا والأغشية ويوجد بنسبة منخفضة جداً في البلاستيدات الخضراء والرايبوسومات.

الوقاية بالتضاد Cross - Protection :

كما هو معروف فإن إصابة نباتات الطماطم بالسلالة المعتدلة من فيروس PSTVd يقبها من إظهار الأعراض (التعبيرات المرضية) عند حدوث إصابة ثانية بالسلالة الشديدة من PSTVd أو الإصابة بفيروس اكسوكورتز الحمضيات CEVd. اعتماداً على ذلك إتجهت الأبحاث لمعرفة فيما إذا كانت إصابة نباتات الطماطم بالسلالة المعتدلة من PSTVd يمكن أن تحفظ النباتات من الإصابة أو إظهار التعبيرات المرضية عند حقنها بالفيروس TPMVd بعد مدة من حقنها بالسلالة المعتدلة من الفيروس PSTVd.

جدول ٤٥ : التركيز النسبي للفيروس TPMVd في أجزاء مختلفة من نباتات الطماطم.

الفهرسة الحيوية		جزء النبات
تجربة ثانية	تجربة أولى	
٥٩	٤٤	جذر
٤٨	٦٥	ساق
٤٥	٤٠	الورقة الأولى والثانية غير مظهرة أعراض
٥٨	٥٣	الورقة الثالثة والرابعة مظهرة أعراض

ملاحظات:

التجربة الأولى: كانت درجة الحرارة في الصوبا الزجاجية منخفضة وكانت الأعراض متوسطة.
 التجربة الثانية: كانت درجة الحرارة في الصوبا الزجاجية ٢٩م والأعراض شديدة.
 كانت تستعمل أربعة تخفيفات للفيروس وهي ١ - بدون تخفيف ٢ - تخفيف ١ : ١٠٠ - ٣ - تخفيف ١ : ١٠٠٠ أو تخفيف ١ : ١٠٠٠٠ - ٤ - تخفيف ١ : ١٠٠٠٠.
 كانت الفهرسة الحيوية تجرى كما في بقية أنواع التجارب بدون تمييز.
 كانت تحقن النباتات في طور الفلقات بمستخلص من نباتات مصابة بالفيروس ثم توضع في الصوبا الزجاجية حتى تصل طول أربعة ورقات ثم يؤخذ منها المستخلص ويقدر فيه الفيروس.

جدول ٤٦: توزيع الفيرويد TPMVd فى الأجزاء تحت الخلوية فى ورقة الطماطم ونسوج الساق.

الفهرسة الحيوية		جزء الخلية المختبر
الأوراق	الساق	
٢٦	٦	النواة
١٨	١٤	البلاستيدات الخضراء
٩	١٩	الميتوكوندريا
٢٤	١٨	الأغشية الخلوية
١٩	١٢	الرايبوسومز
صفر	صفر	بوست رايبوسومال

ملاحظات:

كانت تجرى عملية الفهرسة الحيوية كما فى أى تجربة أخرى.
الأجزاء تحت الخلوية تؤخذ من النباتات المظهرة الأعراض النموذجية.

أجريت تجارب على ثلاثة مجموعات من بادرات الطماطم كل مجموعة فيها أربعة بادرات، حقنت بالسلالة المعتدلة من الفيرويد PSTVd ثم بعد ذلك حقنت بالفيرويد المتحدى TPMVd بعد ٥، ١١، ١٧ يوم. ثم حقنت ثلاثة مجموعات أخرى بالفيرويد TPMVd لوحده أيضاً على فترات ٥، ١١، ١٧ يوم وذلك لمقارنة الأعراض وتأثيرات النمو على كل فيرويد. ثم حقنت ثلاثة مجموعات من بادرات الطماطم بالسلالة المعتدلة من PSTVd لوحدها.

يبين جدول ٤٧ أن النباتات المصابة بالسلالة المعتدلة من فيرويد PSTVd لوحدها لها تأثير قليل على نمو النباتات وتؤدى إلى إصابة متوسطة، بينما الإصابة بالفيرويد TPMVd لوحده يؤدى إلى خفض شديد فى طول النباتات ويسبب أعراض شديدة.

عندما حقنت النباتات بالفيرويد المتحدى TPMVd بعد خمسة أيام من الحقن بالسلالة المعتدلة من PSTVd فإن التقزم الملاحظ في النباتات قد إنخفض قليلاً، بمرور ١٦ - ٤٠ يوم بعد الحقن الأول فإن الأعراض كانت أقل شدة إلى حد ما.

عندما حقنت النباتات بالفيرويد المتحدى TPMVd بعد ١١ و ١٧ يوم من الحقن بالسلالة المعتدلة من فيرويد PSTVd لم يلاحظ تغيرات معنوية في النمو بين النباتات المحقونة بالفيرودين وبين تلك النباتات المحقونة بالفيرويد TPMVd لوحده وذلك بسبب أن موعد الحقن متأخر نوعاً ما وأن النباتات أصبحت أكبر عند حقنها بالفيرويد TPMVd وبالتالي فإن التأثير على النمو إنخفض كثيراً بالمقارنة في التجربة التي فيها تم الحقن بالمتحدى بعد خمسة أيام. عند المقارنة مع الكنترول كان هناك خفض قليل في شدة الأعراض لوحظ ثانية في النباتات المحقونة بالفيرودين، هذا لوحظ بعد ٩، ٤٠ يوماً بعد الحقن الأول في الاختبار مع المتحدى على يوم ١١ ولكن فقط ٤٠ يوم بعد الحقن الأول في الاختبار مع المتحدى على يوم ١٧.

ويمكن القول باختصار أن جميع الاختبارات تدل على أنه، بغض النظر عن مدة الزمن التي تفصل بين حقن النباتات بالسلالة المعتدلة من PSTVd والفيرويد المتحدى TPMVd، يحدث هناك تداخل بسيط في التعبيرات الكاملة لمرض النبات الذكري في الطماطم تحدث في النباتات المحقونة بالفيرودين. هذا التداخل كان بسيطاً بحيث لا ينظر إليه وكأنه ظاهرة وقاية بالتضاد cross - protection. هذا يتأكد بملاحظة أن النباتات المحقونة بالفيرودين، فإن أعراض مرض النبات الذكري تظهر باستمرار مبكراً وكانت بشكل أولى أكثر شدة في النباتات الكنترول التي حقنت بالفيرويد TPMVd في نفس الوقت الذي حقن فيه الفيرويد PSTVd. قد يمكن تفسير ذلك بأنه نوع من ال Synergistic أكثر منه Antagonistic بين الكائنين المرضيين.

جدول ٤٧: تأثير إصابة نباتات الطماطم بالسلالة المعتلة من الفيروس PSTVd على: التغيرات المرضية للإصابة بالفيروس TPMVd.

نظام الحقن (التجربة)				طول النبات سم بعد يوم				كثافة الأعراض على يوم			
				١٦	٢٩	٤٠		١٢	١٦	٢٩	٤٠
١ - بداية الحقن											
أ - سلالة فيروس PSTVd المعتلة لوحدها				١٦	٢٧	٣٣		+	++	++	++
ب - فيروس TPMVd لوحده				١٠	١٢	١٣		+++	++++	++++	++++
ج - كترول				١٨	٢٩	٣٥		-	-	-	-
٢ - حقن المتحدي بعد خمسة أيام											
أ - PSTVd - m / TPMVd				١٣	١٤	١٦		++	+++	+++	+++
ب - فيروس TPMVd لوحده				١١	١١	١٣		+	+++	++++	++++
ج - كترول				١٨	٢٢	٣٧		-	-	-	-
٣ - حقن المتحدي بعد ١١ يوم											
أ - PSTVd - m / TPMVd				١٦	٢٣	٢٦		-	++	++	++
ب - فيروس TPMVd لوحده				١٨	٢٤	٢٦		-	+++	+++	+++
ج - كترول				٢٥	٣٧	٤١		-	-	-	-
٤ - حقن المتحدي بعد ١٧ يوم											
أ - PSTVd - m / TPMVd				١٧	٢٨	٣١		?	?	++	++
ب - فيروس TPMVd لوحده				١٨	٣٠	٣٠		?	?	+++	+++
ج - كترول				٣٠	٤٢	٤٦		-	-	-	-

ملاحظات:

m - PSTVd نقي سلالة فيروس الدرة للخرقة في البطاطس المعتلة.

---: لا يوجد أعراض، ?? لم يجرى لها اختبار، (+) أعراض بسيطة (++) أعراض متوسطة، (+++) أعراض شديدة،

(+++++) أعراض شديدة جداً. كان يستعمل متوسط طول أربعة نباتات.

نباتات الكترول التي لم تحقن بأي من الفيروسين لم تظهر عليها أعراض لأنها سليمة.

العوائل الطبيعية للفيرويد:

اجريت تجربة لتحديد العوائل الطبيعية للفيرويد، جمعت بذور ٥٣ نوع نباتي تمثل ١٥ عائلة نباتية توجد بالقرب من مزارع الطماطم فى المكسيك. حقنت البادرات الناجمة من هذا البذور ميكانيكياً بالفيرويد TPMVd. كانت النتيجة أن أصيب ١٣ نوع من النباتات كلها تتبع العائلة الباذنجانية. وجد أن ثمانية أنواع من هذه الثلاثة عشر تصاب طبيعياً بالفيرويد كان أهمها *Solanum torvum* وإن شدة الأعراض تتراوح من إصابة بسيطة جداً كما فى كل من *Solanum nigrescens* و *Physalis philadelphica* إلى إصابة شديدة جداً كما فى *Lycopersicon esculentum*. وجد أن نسبة تركيز الفيرويد فى جميع العوائل الطبيعية تكون عالية فى فترة الخريف بنسبة ١٤,٥٪ أكثر منها فى الربيع والصيف حيث تكون النسبة ٠,٤٪. بعد أن عرف بأن الفيرويد ينتشر فى ١٩ ولاية فى المكسيك درس التوزيع الجغرافى لهذا المرض وتأثير البيئة فى ذلك فوجد أن الخط الحرارى (الذى يحدد درجات الحرارة) الذى يحدد ٢٢م هو الحدود الفاصلة بين المناطق التى يوجد فيها الفيرويد فى الزراعات البرية لنباتات العائلة الباذنجانية والمنطقة التى لا يوجد فيها الفيرويد، على هذه النباتات ووجد أنه ينتشر فى مقاطعة Tepalcingo بنسبة ٣٢,٥٪ فى نباتات الطماطم. بناءً على هذه النتائج إنجّه البحث لمعرفة العامل الناقل للفيرويد والذى يجب أن يتوفر فى الشتاء والخريف ولا يظهر فى الربيع والصيف.

انتقال الفيرويد:

سبق وأن ذكرنا أن فيرويد TPMVd ينتقل ميكانيكياً بسهولة سواء بالاحتكاك أو بالأدوات الزراعية الملوثة أو أثناء إجراء العمليات الزراعية والملاسة بالأيدى الملوثة. إن دراسة إنتشار الفيرويد والظروف الحرارية التى تحيط بانتشاره جعلت الباحثين لا يقفوا مكتوفى الأيدى ويكتفوا بالقول بأن الفيرويد ينتقل ميكانيكياً. إستمرت الأبحاث المضنية أربع سنوات على هذا الفيرويد لمعرفة طرق إنتقاله، أعطت هذه الأبحاث نتائج مثمرة وذلك باكتشاف ناقل حشرى ولتأكيد هذا استمر البحث

على هذا الناقل مدة ستة شهور بعد ذلك صدر القرار النهائي وهو أن حشرة المن *Myzus Persicae* هي الناقل النشط لهذا الفيرويد. إن حشرة المن المذكورة تتجمع على نباتات الفاسيايز من العائلة الباذنجانية *Physalis aff foetens* وهو نبات برى عائل للفيرويد وأن حشرة المن تعيش على هذا النبات وبالتالي تنقل الفيرويد من العائل البرى إلى النباتات المزروعة. ولقد وجد أيضاً أن جميع أطوار الحشرة قادرة على أن تنقل هذا الفيرويد. ولقد وجد أيضاً أن هذا العائل يؤثر على درجة النقل بحشرة المن عندما يستعمل كمصدر للفيرويد.

إن نبات *Physalis aff foetens* يلاحم إنتقال الفيرويد بنسبة ٩٧٪ بينما نباتات الطماطم لا تساهم في نقل الفيرويد إلا بنسبة ٣٣٪. وجد أن الفيرويد يبقى في الحشرة لمدة ٢٤ ساعة بعد اكتسابها له. يبدو أن الحشرة تتكاثر على سبعة أنواع من النباتات والتي هي أيضاً عوائل للفيرويد. إن نبات *Solanum rostratum* هو أكثر الأنواع مناسبة لتكاثر الحشرة وبالتالي لإنتشار الفيرويد. أما نبات الطماطم فهو أقل الأنواع ملائمة لتكاثر الحشرة الناقلة. إن الحشرة تزداد أعدادها إلى أقصى حد في شهر يناير وتصل أدنى حد من التكاثر في شهر مايو وهذا ما يتوافق مع إنتشار الفيرويد على نباتات الطماطم ويمكن اعتماداً على ذلك وضع برنامج جيد لمقاومة الحشرة وبالتالي مقاومة الفيرويد بطريق غير مباشر.

ب - عرض تقزم قمة الطماطم

Tomato Apical Stunt Disease

يتسبب هذا المرض عن فيرويد تقزم قمة الطماطم (TASVd) *Stunt Viroid*. لهذا الفيرويد سلالتين السلالة الأولى اسمها سلالة ساحل العاج وتتكون من ٣٦٠ نيوكليتيده والثانية سلالة إندونيسيا وتتكون من ٣٦٣ نيوكليتيده. تبلغ نسبة تماثل التتابع في هذا الفيرويد ٩١٪. يسبب أعراض شديدة على الطماطم صنف Rutgers.

تظهر الأعراض على شكل تقزم فى قمة النبات بحيث تقصر السلااميات وتصغر الأوراق (شكل ٧٠). تصفر الأوراق السفلية وتسقط تبقى النباتات ضعيفة وينخفض الإنتاج كثيراً. ينتقل الفيرويد ميكانيكياً بسهولة عن طريق تلوث الأيدى والأدوات الزراعية وأثناء العمليات الزراعية.

هناك تجارب كثيرة على هذا الفيرويد بحيث يتكون فيرويد جديد مركب من جزئين جزء من فيرويد تقزم القمة فى الطماطم والجزء الثانى من فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس أو فيرويد اكسوكورتز الحمضيات. وبالفعل أمكن تركيب فيرويد جديد فيه صفات الفيرودين وهذه أبحاث كثيرة لا مجال لذكرها هنا.



شكل رقم ٧٠:

أعراض الإصابة بفيرويد تقزم القمة فى الطماطم.

١ - كنترول ٢ - الإصابة بالعزلة الأندونيسية ٣ - الإصابة بعزلة ساحل العاج.

جـ - مرض القمة الشجرية فى الطماطم

Bunchy Top Disease of Tomato

مقدمة:

كان أول وصف لهذا المرض فى جنوب أفريقيا وذلك سنة ١٩٣١ من قبل العالم McClean. إستمرت أبحاث هذا العالم على مرض القمة الشجرية فى

الطماطم لغاية سنة ١٩٣٥ وذكر بأن هذا المرض ينتشر في جنوب أفريقيا ويسبب خسائر كبيرة في محصول الطماطم ونشر أول بحث عن هذا المرض في مجلة اسمها South African Department of Agriculture Science Bulletin 139. ذكرت الأعراض ونسبة الإصابة والخسائر إلا أن مسبب المرض إفتراض على أنه فيروس، مع ذلك فإن طرق الانتقال وصفات المسبب لم توضح في تلك الأبحاث وقيمت الشكوك محيطة بهذا المسبب المرضى. في سنة ١٩٧٩ ذكر هذا المرض في الهند وأجريت عليه تجارب عديدة إلا أنها لم تحدد المسبب ولا طريقة الانتقال. في سنة ١٩٨١ كان هناك وصف لهذا المرض في المجلة العلمية الأكاديمية في غرب أفريقيا. إن مرض القعة الشجرية في الطماطم ينتشر في الهند بشكل كبير ويسبب خسائر كبيرة ولذلك يسمى باسم مرض القعة الشجرية الهندي في الطماطم Indian Bunchy Top Disease of Tomato. أجريت تجارب عديدة على مسبب المرض في الهند واتجهت هذه الأبحاث إلى الفيروس واستبعدت الفيروس. لقد عزل الفيروس من نباتات الطماطم *Lycopersicon esculentum* المصابة بمرض التقزم الشجري الهندي. باستعمال طرق الاختبارات Blot hybridization بالمنقب cRNA المعلم بالفسفور المشع ٣٢ المخصص لاكتشاف الفيروسات المختلفة، وجد أن هذا الفيروس الهندي شديد التقارب والعلاقة مع فيروس اكسوكورتز الحمضيات CEVd. ولقد أظهر تحديد النتائج أن الفيروس يتكون من ٣٧٢ نيوكليتيده ولقد أعطى اسم فيروس اكسوكورتز الحمضيات سلالة الطماطم CEVd - t وهذه السلالة تختلف عن السلالات الأسترالية للفيروس CEVd بستة وثلاثين نيوكليتيده عن السلالة A و ٤٧ نيوكليتيده عن السلالة B ويختلف عن سلالة العنب الأسبانية بتغير ٥٢ نيوكليتيده. وتحليل النشوء الوراثي لهذا الفيروس تؤكد بأنه قريب الصلة مع فيروس CEVd في جميع تركيب النطاقات باستثناء نطاق المرضية والنطاقات الطرفية اليسارية والتي هي مطابقة تماماً لما هو في فيروس الدرة المغزلية في البطاطس وفيروس تقزم القعة في الطماطم.

الأعراض:

يصيب هذا المرض نبات الطماطم *Lycopersicon esculentum* وتظهر الأعراض على شكل توالد مستمر وغزير من النموات الحديثة فى قمة النبات مصحوباً بتقزم هذه النموات الحديثة وتدليها وحدوث تشوهات كثيرة مختلفة فى أنصال الأوراق (الوريقات) ونكروز فى العروق. تتشابه أعراض هذا المرض مع مرض تقزم القمة فى الطماطم المذكور سابقاً ويصعب التمييز بينهما إلا بالعين الخبيرة حيث أن هذا المرض تكون فيه قمم النباتات أكثر غزارة من المرض الأول وتكون الأوراق الصفراء قليلة فى مرض شجيرة الطماطم الهندى ولكن هذه الأخيرة ليست علامة مميزة دائماً بل قد يحدث العكس عند اختلاف درجات الحرارة عن الظروف المثلى للنبات.

المسبب:

يتسبب مرض القمة الشجرية الهندى فى الطماطم عن فيروس هو عبارة عن سلالة من سلالات فيروس اكسوكورتز الحمضيات CEVd ويطلق عليه CEVd-t ويتكون هذا الفيروس من 372 نيوكليتيده تتكون من 109 A و 113 G و 78 U وبذلك تكون محتوياته من G + C تساوى 59,7% وهى قريبة من الفيروسات النموذجية الأخرى. وأن نسبة G + C إلى نسبة A + U تساوى 1,48 وإن التركيب الثانوى لهذا الفيروس يتكون من أزواج قواعد عالية ويأخذ ظاهرياً شكل عصوى ثنائى الخيط والذى فيه مناطق حلزونية قصيرة التابع مع عروات متفتحة داخلية.

بتحليل تتابع تركيب النطاقات الخمسة لهذا الفيروس ومقارنتها مع الفيروسات الأخرى والفيروسايدات أعطت النتيجة المذكورة فى جدول 48. إن المنطقة متغيرة النطاق ونطاقات جانب الطرف الأيمن قريبة الشبه غالباً مع ما هو موجود فى فيروس

اكسوكورتز الحمضيات CEVd، بينما نطاق المرضية يشبه فيروس الدرة المغزلية في البطاطس PSTVd أما الطرف اليسارى فهو أكثر تشابهاً وقرباً مع فيروس تقزم قمة الطماطم TASVd.

إن حدود النطاقات لفيروس القمة الشجرية الهندى عزلة t-CEVd هى كما يلى :-

- ١ - نطاق الطرف الأيسر من ٣٢٦ إلى ٣٧٢ فى الخيط السفلى ٩٣
ومن ١ إلى ٤٦ فى الخيط العلوى نيوكليتيده
- ٢ - نطاق المرضية من ٤٧ إلى ٧٥ فى الخيط العلوى ٩١
ومن ٢٩٤ إلى ٣٢٥ فى الخيط السفلى نيوكليتيده
- ٣ - المنطقة المركزية المحفوظة من ٧٦ - ١٢٢ فى الخيط العلوى ٩٧
ومن ٢٤٤ إلى ٢٩٣ فى الخيط السفلى نيوكليتيده
- ٤ - المنطقة المتغيرة من ١٢٣ إلى ١٥٠ فى الخيط العلوى ٥٧
ومن ٢١٥ إلى ٢٤٣ فى الخيط السفلى نيوكليتيده
- ٥ - نطاق الطرف الأيمن من ١٥١ إلى ٢١٤ تأخذ جزء من الخيط العلوى
وجزاء من الخيط السفلى يتكون من ٦٤ نيوكليتيده.

المميزات العامة للمسبب:

الصفة الأولى :-

من نتائج الدراسات السابقة تبين أن مرض القمة الشجرية الهندى فى الطماطم يتسبب عن فيروس وأن هذا الفيروس من سلالات الفيرويدات التى تصيب الطماطم

جدول ١٨: بين أعداد النيوكليوتيدات المنتشرة في كل نطاق بالنسبة للفيروسات-١. CEVd.

الفيروسات وسلاسلها	عدد النيوكليوتيدات المنتشرة الموجودة في كل نطاق من الفيروسات عن فيروس القملة الصحيرية في المناطق									
	الطرف اليسار		الطرفية		المنطقة المركزية المغطاة		المنطقة المنتشرة		الطرف اليمين	
	عدد	Z	عدد	Z	عدد	Z	عدد	Z	عدد	المجموع
١- CEVd										
السلسلة الأسترالية A	١	٠,٩	١٤	٢٢,٩	صفر	صفر	١٦	٢٨,٠٧	٥	٧,٨١
السلسلة الأسترالية B	١١	١١,٨	١٥	٢٤,٥٩	٢	٢,٠٦	١٥	٢٦,٣	٤	٦,٢٥
السلسلة الأسترالية G	١٢	١٢,٩	١٣	٢١,٣١	٣	٣,٠٩	١٦	٢٨,٠٧	٩	١٤,٠٦
٢- PSTVd										
السلسلة للوسيلة I	٤٣	٤٦,٢٣	١٣	٢١,٣	٥١	٥٢,٥٧	٨٤	١٤٧,٣٦	٤٣	٦٧,١٨
السلسلة للوسيلة M	٤٣	٤٦,٢٣	١٥	٢٥	٥٠	٥١,٥٤	٨٣	١٤٥,٦	٤٣	٦٧,١٨
السلسلة للوسيلة S	٤٦	٤٩	١٤	٢٢,٩٥	٥١	٥٢,٥٧	٨٤	١٤٧,٣٦	٤٣	٦٧,١٨
٣- TASVd										
عزلة أفريقيا	٨	٨,٦	٥٠	٨١,٩٧	١٨	١٨,٥٥	١٠٦	١٨٥,٩٥	٤٩	٧٦,٥٦
عزلة ليتوانيا	١٠	١,٠٧	٤٤	٧٢,٣	٢١	٢١,٦٤	١١٤	٢٠٠	٤٦	٧١,٨٧
٤- TPMVd	٤٣	٤٦,٢٣	٣٧	٥٢,٤٦	٥٠	٥١,٥٤	١١٤	٢٠٠	٤٧	٧٣,٤٣

ملاحظات:

محو فيروسات-١: الطرف اليسار ٩٣، نطاق الطرفية ١١، المنطقة المركزية المغطاة ٩٧، المنطقة المنتشرة ٥٧، الطرف اليمين ٦٤.

نسبة التكرار المزدوجة عن ١١٠٠ ملى أن نيوكليوتيدات الفيروسات للقران أكثر من نيوكليوتيدات-١ CEVd وكلها مختلفة.

مثل فيروس تدقزم القمة فى الطماطم TASVd أو فيروس النبات الذكورى فى الطماطم TPMVd ولكنه سلالة مميزة من سلالات فيروس اكسوكورتز الحمضيات CEVd ولم يسبق لهذا الفيروس أو هذا المرض أن وجد مترافقاً مع أمراض أخرى من أمراض الطماطم. لقد ثبتت العلاقة القوية لهذا الفيروس مع فيروس CEVd بواسطة اختبار Blot - hybridization وباستعمال cRNAs متخصصة لاكتشاف عدد كبير من الفيروسات وأن تحليل النتائج قد أكد بأن هذا الفيروس هو سلالة منفصلة من CEVd، وأطلق عليه اصطلاح سلالة الطماطم من فيروس اكسوكورتز الحمضيات t-CEVd. مع أن فيروس تدقزم قمة الطماطم وفيروس النبات الذكورى فى الطماطم تسبب أمراض تحدث طبيعياً ومنتشرة فى مناطق كثيرة، إلا أن مرض القمة الشجرية الهندى هو أول مرض يصيب الطماطم ويتسبب عن فيروس CEVd.

الصفة الثانية:

إن فيروس t-CEVd أكثر قرباً وعلاقة مع فيروس العزلة الأسترالية A، حيث أن هناك اختلاف فى ٣٦ تغير فى النيوكليوتيدات، حصل استبدال فى ٢٩، وثلاثة إضافة (ادخال) و إزالة ٤. أما فى العزلة الأسترالية B هناك اختلاف فى ٤٧ نيوكليوتيدة منها ٣٨ استبدال و ٤ إضافة (ادخال) و ٤ إزالة أما فى سلالة العنب من CEVd فإن لتغير فى ٥٣ نيوكليوتيدة، منها ٤٦ إزالة وإضافة ٢ وخمسة حذف.

كما هو الحال فى عزلة العنب الأسترالية g-CEVd فإن تتابع النيوكليوتيدات فى t-CEVd تختلف كثيراً عن السلالات A، B وهذا الاختلاف أكثر من الاختلافات الموجودة بين B و A نفسها، مما يدل على الانعزال النسبى لكل من g-CEVd و t-CEVd عن بقية سلالات CEVd المعزولة من الحمضيات، وقد يرجع سبب ذلك لإختلاف أصل العائل هذا يعنى العنب والطماطم حيث الاختلاف النباتى بينهما كبير.

الصفة الثالثة:

إن الاختلافات التي تحول CEVd - A إلى CEVd - t موجودة أساساً في الطرف اليسارى وفي نطاق المرضية والنطاق (المنطقة) المتغير، بينما النطاق المركزى ومنطقة الطرف اليمين لا تخضع أساساً لأى تغيرات. كذلك فإن CEVd - t يشابه أيضاً CEVd - g في هذه المجالات إلا أن منطقة الطرف اليمين ومنطقة الطرف اليسار تختلف معنوياً عن CEVd - A.

إن تغيير النيوكليوتيدات بين سلالات CEVd المؤدية إلى تحورات في التركيب الثانوى المفترض لنطاق المرضية قد استخدمت من قبل الفيرويد في تحويرات التعبيرات المرضية على الطماطم. ولقد ثبت أن معظم هذه التغيرات التي تؤدي إلى تركيب ثانوى مختلف في نطاق المرضية للسلالات المعتدلة (عند مقارنتها مع السلالات الشديدة) تتواجد خارج القلب المركزى والذي هو محفوظ بشدة في جميع السلالات الشديدة. هذا القلب المركزى يتكون من 6 - As تتابع (غالباً في عروة داخلية) وملاصقة لزوج قواعد السيقان. بفحص القلب المركزى في CEVd - t تبين أن تركيبه الثانوى نموذجي كما هو في جميع السلالات الشديدة باستثناء الثمانية قواعد الموجودة في المنطقة الحلزونية إلى اليمين من تتابع (A) Aligo الموجود في السلالات الشديدة من CEVd التي تتعرق بواسطة دخول (غرز) خمسة نيوكليوتيدات تؤدي إلى عروة داخلية من ثلاثة مراكز قواعد مزدوجة (U - A). إن تخفيض الثبات الحرارى لهذه المنطقة الموضعية لا يؤثر بالضرورة على شدة التعبيرات المرضية. هذا يكون واضحاً أكثر بحقيقة أن القلب المركزى لنطاق المرضية موجود في كل السلالات الشديدة من الفيرويد CEVd (باستثناء CEVd - t)، تحدث أيضاً في جميع سلالات PSTVd بغض النظر فيما إذا كانت تحدث أعراض متوسطة أو معتدلة أو شديدة في الطماطم.

الصفة الرابعة:

إن دراسة نشوء الفيروسات أجريت مع كل تركيب لكل نطاق بمفرده في الفيروسات المختلفة وهذا أدى إلى القول بأن النطاقات المتماثلة في مختلف الفيروسات قابلة للتغير وهذا يكون أكثر وضوحاً عن طريق ملاحظة تتابع النيوكليوتيدات في فيروس *Columnnea* الكامن والذي يتكون من تتابعات سائدة تبين أنها موجودة في فيروسات أخرى. ونتيجة معرفة تتابع فيروس العنب الاسترالي والذي إقترح بأنه نتيجة لإعادة الاتحاد (الارتباط) المتكررة في RNA. بالمثل يمكن القول بأن الفيروس *t - CEVd* هو نتيجة إعادة الاتحاد بين RNA في فيروسات مختلفة أو يمكن القول بأن هذا الفيروس *t - CEVd* هو حلقة بين فيروس *PSTVd* وفيروس *TASVd* التي تسبب أعراض مرضية في الطماطم. أو القول بأنه مركب من جزئين من الفيروسين الذين يصيبان الطماطم.

٧ - فيروس الخيار

Cucumber Viroid

مرض الثمرة الباهتة في الخيار

Cucumber Pale Fruit Disease

أعراض المرض:

يهاجم هذا المرض نباتات الخيار *Cucumis sativus* تظهر النباتات المصابة متقزمة فيها شفافية عروق وتتجدد الورقة قبل أن تسقط. تصفر الأوراق السفلى وتسقط أحياناً وتجف أحياناً أخرى قبل أن تسقط، يضعف المجموع الخضري ويضعف نمو النبات وتقل الانتاجية. تصبح الثمار صفراء أو خضراء باهتة وتكون متكرمشة أحياناً وذات شكل غير منتظم يقل الانتاج بنسبة كبيرة، تصبح الثمار غير صالحة للتسويق. يتشابه هذا المرض في أعراضه مع أعراض كثير من أمراض الفيروسات التي تهاجم الخيار إلا أن الميزة الرئيسية التي تميزه عن الإصابات الفيروسية هو عدم ظهور تلونات أو موزايك في نصل الورقة باستثناء شفافية العروق. وكذلك لا يتكون زوائد على الثمرة ولا يصبح نسيجها اسفنجياً كما في بعض الإصابات الفيروسية.

المسبب:

يتسبب هذا المرض عن فيروس الثمرة الباهتة في الخيار Cucumber Pale Fruit Viroid ويكتب باختصار (CPFVd). بقى الاعتقاد سائداً بأن هذا المرض يتسبب عن فيروس تقزم حشيشة الدينار HSVd حيث أن فيروس تقزم حشيشة الدينار له

سلالات عديدة ويتراوح عدد النيوكليوتيدات في هذه السلالات من ٢٩٧ إلى ٣٠٣، إلا أن السلالة التي تصيب نبات الخيار طولها ٢٩٧ نيوكليوتيدة. ولقد وجد أن فيروس الثمرة الباهتة في الخيار CPFVd يتكون من ٣٠٣ نيوكليوتيدة. ولقد أجريت تحاليل عديدة وتجارب تمييز بين هذا الفيروس وسلالة فيروس HSVd فأصبح من المؤكد أن هذا الفيروس CPFVd هو فيروس منفصل لوحده وليس عزلة من عزلات فيروس تقزم حشيشة الدينار، إلا أن هناك كثير من المراجع لا تزال تذكر أن فيروس الثمرة الباهتة في الخيار هو عزلة من عزلات فيروس تقزم حشيشة الدينار.

هناك أسباب أدت إلى الاعتقاد بأن فيروس CPFVd هو عزلة من عزلات HSVd

وهي :-

١ - إن بعض عزلات فيروس HSVd تسبب أعراض على نبات الخيار متماثلة تماماً مع ما يسببه فيروس الثمرة الباهتة في الخيار.

٢ - لا يمكن التفريق بين عزلة فيروس HSVd وفيروس CPFVd اعتماداً على الأعراض أبداً.

٣ - كلا الفيروسين له تماثل تتابع عال جداً يصل ٩٥٪ إلا أنه غير متطابق.

٤ - العوائل التي تصيبها عزلة HSVd هي نفسها التي يصيبها الفيروس CPFVd.

معظم الأبحاث أقرت بأن فيروس CPFVd وفيروس HSVd كلاهما عامل مسبب لمرض الثمرة الباهتة في الخيار وهما يوجدان منفصلين في عوائل نباتية مختلفة مثل *Cucumis sativus* للفيروس الأول و *Humulus lupulus* للفيروس الثاني في مناطق مختلفة. يمكن فصل الفيروسين بطريقة PAGE ووجد أن فيروس CPFVd أكبر من فيروس HSVd بحوالي ستة نيوكليوتيدات وإن كلا الفيروسين فيه تماثل تتابع عال جداً إلا أنها غير متطابقة. يختلف CPFVd عن الفيروس HSVd عزلة الخيار في تتابع النيوكليوتيدات على موقع ١٦ والذي يتضمن

تغيير ٨ نيوكليوتيدات ودخول ٧ نيوكليوتيدات وحذف واحدة من HSVd. كلا الفيرودين فيهما تماثل تتابع ٩٥٪. إن فيروسد CPFVd يشكل تركيب شبه عصوى مع عديد من أزواج القواعد وأنه يتماثل مع PSTVd بنسبة ٥٥٪ ونفس النسبة مع فيروسد HSVd عزلة الخيار. كذلك فإن تماثل عزلات CPFVd يصل ٩٥٪ أما تماثل عزلات HSVd فهو ١٠٠٪. كلا الفيرودين يسبب إصابة كامنة في الطماطم ولا يهاجمان نبات *Gymna*.

انتقال الفيرويد:

ينتقل فيروسد CPFVd خلال بذور وحبوب اللقاح في الطماطم صنف Rutgers وتصبح النباتات مصابة جهازياً وتظهر الأعراض على النباتات وينخفض الإنتاج، لكن نباتات الطماطم النامية من بذور مصابة لا يظهر عليها أعراض ولكن يمكن اكتشاف الفيرويد فيها بطريقة electrophoresis على ٥٪ بولي أكريلاميد جيل ويكشف عن الفيرويد في البذور بواسطة Spot hybridization.

يتحرك الشكل الدائري من الفيرويد في الهجرة الكهربائية أقل من سرعة فيروسد HSVd عزلة الخيار. أما الشكل المستقيم للفيرويد لم يمكن كشفه بالصبغ في الجيل ولكن يستدل عليه بالاختبارات الحيوية. يبلغ متوسط طول الشكل الدائري لفيرويد CPFVd حوالي (٨٢ ± ٤,٢) نانومتر أما طول الشكل الدائري لفيرويد HSVd عزلة الخيار (٨٣ ± ٢,٤) نانومتر.

المدى العائلي:

وجد أن هناك ١٢ نوعاً من العائلة القرعية من ٢٦ نوع تصاب بفيروسد HSVd عزلة الخيار وتختلف شدة الإصابة حسب نوع النبات المزروع وحسب الصنف وإن العوامل القابلة للإصابة بالفيروسد HSVd عزلة الخيار والتي تظهر أعراض قابلة للتشخيص هي: -

- 1 - *Benincase hispida*
- 2 - *Cucumis melo* Var. *acidulus*
- 3 - *Cucumis melo* Var. *conomon*
- 4 - *Cucumis melo* Var. *inodorus*
- 5 - *Cucumis melo* Var. *reticulatus*
- 6 - *Lagenaria siceraria* Var. *clavata*
- 7 - *Lagenaria siceraria* Var. *gourda*
- 8 - *Lagenaria siceraria* Var. *microcarpa*
- 9 - *Luffa cylindrica*
- 10 - *Cucurbita moschata*

فيروس HSVd عزلة الخيار:

كما هو معروف فإن إصابة بادرات الخيار بفيروس HSVd عزلة الخيار يسبب تقزم ملحوظ وأوراق غائرة العروق مجعدة. نتيجة الإصابة بهذا الفيروس يحدث نقص في نسبة منظم النمو أندول أستك أسد في أول عشرة أيام بعد الحقن وقبل تجعد الورقة ويستمر على الأقل لمدة ٣٠ يوم. كذلك تتأخر الأزهار المؤنثة في الظهور عن الوقت المعتاد. أما منظم النمو الجبرلك أسد فإن مستوياته لا تتأثر بالإصابة.

درس تأثير عدة مواد كيميائية على حيوية فيروس HSVd عزلة الخيار فوجد أن حيوية الفيروس تزداد بإضافة البنتونايت Bentonite ولكنها تنخفض بإضافة أوكسالات الصوديوم و RNA الخميرة. زادت الحيوية قليلاً باستعمال تانك أسد بتركيز ١,٠ ملغ / ملتر وقلت الحيوية أيضاً باستعمال تانك أسد بتركيز ١ ملغ / ملتر. تثبط نشاط الفيروس كلية باستعمال RNase البنكرياس وكذلك بإضافة Acridine orange وازرق الميثيلين و Toluidine blue O عندما يكون الفيروس تحت الإضاءة العادية أما تحت الظلام فإن الحيوية انخفضت بنسبة أقل. إن تثبط الحيوية باستعمال Bentonite مع مخلوط الفيروس يحدث مع الصبغة أما بدون صبغة فتزداد الحيوية.

٨ - فيروسات كوليومنيا

Columnnea Viroids

١ - فيروس كوليومنيا الكامن

Columnnea Latent Viroid

مقدمة:

إن نبات *Columnnea* من نباتات الزينة التابعة للعائلة الجسنراسية *Gesneriaceae*. إن هذا النبات يسمى *Epiphytic* وهو عبارة عن تحت شجيرات *Subshrubs* أو أعناب منشأوها جنوب أمريكا وهي تنمو في سلال معلقة في الصوبات الزجاجية أو البيوت في أمريكا الشمالية. يتكاثر هذا النبات أساساً عن طريق العقل المأخوذة من الساق وهي تستطيع أن تحافظ وتدبم الفيروس فيها.

الفيروس:

إن فيروس الكوليومنيا الكامن (*Columnnea Latent Viroid (CLVd)*) يوجد بشكل كامن في نبات الزينة المسمى *Columnnea erythrophae* والذي ينمو تجارياً. إذا هاجم الفيروس البطاطس والبطاطم فإنه يسبب أعراض شبيهة بأعراض فيروس الدرنلة المغزلية في البطاطس عند مهاجمته للبطاطس. إن تتابع نيوكليوتيدات هذا الفيروس وتركيبه الثانوي المقترح يبين أنه يتكون من RNA أحادي الخيط دائري يتكون من ٣٧٠ نيوكليوتيدة والتي تأخذ التركيب ذو الشكل العصوي بعيد من أزواج القواعد والتي تميز جميع الفيروسات المعروفة. إن الحركة في الهجرة الكهربائية للفيروس

الدائري CLVd تحت ظروف غير مدنترة تؤدي إلى القول بوجود التركيب الثلاثي.

يحتوي الفيرويد CLVd العديد من تماثل التتابع المشابهة لما في مجموعة فيرويدات PSTVd ولكنه يحتوي منطقة مركزية محفوظة نموذجية كما هو موجود في فيرويد تقزم حشيشة الدينار HSVd. كذلك فإن الفيرويد CLVd يشارك في بعض الصفات الحيوية مع كل من مجموعة الفيرويدات B2 و B3. من المحتمل أن يكون الفيرويد CLVd قد نشأ نتيجة من تداخل وإعادة الاتحاد للحمض RNA بين مجموعة HSVd ومجموعة فيرويدات PSTVd أثناء تكاثرهما في نفس النبات.

ب - فيرويد نيماتانتش

Nematanthus Viroid

مقدمة:

عزل فيرويد من نباتات زينة اسمها *Nematanthus wettsteinii* هذه النباتات غير مظهرة لأعراض مرضية، وذلك باستعمال طريقة R - PAGE وذلك لتحليل الأحماض النووية منخفضة الوزن الجزيئي. أمكن نقل الحمض النووي إلى الطماطم وثلاثة أصناف مزروعة من البطاطس ونباتات *Scopolia sinensis* بالحقن الميكانيكي أو بالتطعيم. إن نباتات العائلة الباذنجانية المحقونة يتكشف عليها أعراض مشابهة لتلك المتسببة عن فيرويد الدرنه المغزلية في البطاطس PSTVd. إن فيرويد نيماتانتش يتكون من 372 نيوكليتيده، تركيبها كالأتي: - 214 من G + C و 108 من A + U وأن نسبة G + C / A + U تساوي 1.35. إن واحدة من سبعة كلونات cDNA أظهرت إختلاف في التتابع G to A على موقع 73. إن أكثر التراكيب الثانوية نباتاً لهذا الفيرويد هي تلك التي تمتلك ازواج قواعد G : C و 78 A : U و 37 G : U مع أقل طاقة حرة من (456.9 KJ -). إن هذا الفيرويد متقارب تماماً مع فيرويد كوليومنيا الكامن الذي يتكون من 370 نيوكليتيده. إن فيرويد نيماتانتش

يمتلك مناطق ذات تتابع متماثل ١٠٠٪ مع ستة فيروسات تتبع مجموعة PSTVd ومجموعة فيروس ندب الجلد في التفاح ASSVd. كذلك فإن الفيروس يتناسخ في نباتات الطماطم عندما تخزن مع PSTVd. كذلك فإنه يمكن وقاية نباتات الطماطم بالوقاية بالتضاد ضد فيروس PSTVd عندما حقنت مقدماً بالفيروس نيماتانثس.

الأعراض:

يتكشف على النباتات المصابة بهذا الفيروس أعراض تتميز بأنها ميكروسكوبية. في الطماطم تظهر الأعراض على شكل صفر الأوراق بحيث تكون أصغر من الوضع الطبيعي والتي تتقدم مججمة في قمة النبات. أحياناً فإن العروق الوسطية من الأوراق يتكشف عليها خطوط ميتة ومتحللة Necrotic streaks. هناك فرق معنوي كبير بين طول النباتات المصابة والسليمة حيث تكون النباتات المصابة متقزمة بشكل واضح.

أما في نباتات *S. sinensis* يتكشف عليها بقع متحللة جهازية وتخطيطات بالإضافة إلى أن الورقة تصل طور الشيخوخة قبل أن تنضج. إن هذه الأعراض مماثلة جداً لتلك المحدثة بواسطة الفيروس PSTVd في العوائل الخاصة به. إن إصابة نباتات الطماطم بالفيروس CLVd - N يظهر عليها أعراض معتدلة تظهر بعد ٣ - ٤ أسابيع ويتكشف أوراق أصغر من الأوراق الطبيعية ويحدث تقزم في النبات.

الفيروس:

لقد وجد أن الفيروس المستخلص من نبات *Columnnea* يستطيع أن يصيب نباتات العائلة الباذنجانية ومن ضمنها البطاطس. كما أن نبات *Columnnea* يستطيع أن يحافظ ويديم الفيروس فيه (يجعله مستمراً فيه) بطريقة غير محددة وأحياناً ينقله. في الحصر المحدود لنباتات الزينة في أمريكا اكتشف إصابة بالفيروس غير مظهرة أعراض في نبات الزهرة الجرابية *Nematanthus (Hypocryta) wettsteinii*. إن هذا الفيروس يتكون من ٣٧٢ نيوكليوتيدة وفيه ٩٧,٨ تماثل مع الفيروس الكامن

لنبات *Columnnea* والذي يكتب CLVd. ولقد وجد أنه كما في CLVd فإن الفيرويد المأخوذ من *N. wettsteinii* يصيب نباتات العائلة الباذنجانية ومن ضمنها البطاطس. وبسبب قربه التام والعلاقة الوراثية مع CLVd فإن هذا الفيرويد يُعتبر سلالة متميزة من CLVd تحدث طبيعياً في النبات من أنواع *Nematanthus* وأعطى اسم CLVd - N.

انتقال الفيرويد:

أخذت نباتات طماطم ونباتات *S. sinensis* ونباتات بطاطس وحقت ميكانيكياً بمستخلصات الحمض النووي المأخوذ من نباتات مريضة من *N. wettsteinii* فكانت نسبة الإصابة ٣٠ نبات من بين ٩٣ نبات محقون. أما بالتطعيم فأصبحت ٢٠ بادرة من ٦٣ نبات مطعوم. أما بواسطة التجريح فأصيب ٣ نباتات من ١٥ نبات معامل. يحدث هذا الفيرويد أعراض على نباتات العائلة الباذنجانية تشبه الأعراض الناتجة عن PSTVd. لم يثبت لغاية الآن (١٩٩٢) انتقال الفيرويد بالبذر سواء في البطاطس أو الطماطم أو كولومبيا.

تداخل الفيرويد والوقاية بالتضاد:

عندما حققت نباتات الطماطم بالفيرويد PSTVd السلالة المعتدلة وكذلك بالفيرويد CLVd - N أعطت نفس الأعراض، وبالتالي فإن تأخير ظهور الأعراض لا يمكن استعماله لتحديد تداخل الفيرويدات. إن اكتشاف وتقدير كمية شرائح RNA الفيرويدي بواسطة R - PAGE استعملت لدراسة تفاعلات الفيرويد في الإصابات المختلطة. النباتات المحقونة بلفاح مركب يحوي كلا الفيرويديين تصبح مصابة بكلا الفيرويديين بغض النظر عن مرحلة النمو وقت الحقن.

في دراسات الوقاية بالتضاد، عندما حققت النباتات بفيرويد PSTVd السلالة المعتدلة ثم بعد ذلك حققت بالمتحدى الفيرويد CLVd - N فإن الأخير قد اكتشف

بعد ثمانية أسابيع من الحقن وبالمقابل عندما حقنت النباتات بالفيرويد CLVd - N وبعد ذلك حقنت بالسلالة المعتدلة من PSTVd فإن هذه الأخيرة لم تكتشف بعد ثمانية أسابيع ولكنها احتاجت إلى أكثر من ذلك بكثير مما يدل على حدوث وقاية بالتضاد لنباتات الطماطم من الإصابة بالسلالة المعتدلة من الفيرويد PSTVd. وهذا يعنى أن الحقن السابق بالفيرويد CLVd - N تمنع السلالة المعتدلة PSTVd من أن تثبت أقدامها في النبات.

تمثيل تتابع الفيرويد مع الفيرويدات الأخرى:

عند مقارنة تتابع الفيرويد CLVd - N مع الفيرويدات الأخرى تبين أن هناك قرابة وثيقة جداً مع الفيرويد CLVd الذى يتكون من ٣٧٠ نيوكليتيده. من بين النيوكليتيديات ال ٣٧٢ التى يتكون منها CLVd - N فإن هناك ٣٦٢ نيوكليتيده متوافقة مع تتابعات موجودة فى CLVd. كما أن CLVd - N يختلف عن تتابعات CLVd فى نطلق P من الخيط السفلى حيث UUC تنقلب إلى UGUCU أما فى الخيط العلوى فإن نطاق V يحدث فيه إنقلاب من UGCC إلى ACG.

إن الفيرويد CLVd - N يظهر تمثيل جزئى مع كثير من الفيرويدات تتبع بشكل أساسى إلى مجموعة PSTVd. إن نطاق الطرف اليسارى من CLVd - N يكون متماثل مع تلك الموجودة فى الطرف اليسارى لكل من PSTVd و CSVd و CEVd و ASSVd و TASVd. أما نطاق الجانب الأيمن للفيرويد CLVd - N يتمثل مع فيرويد TPMVd و TASVd و PSTVd. إن الأربعة عشر نيوكليتيده من CLVd - N الممتدة فى الخيط العلوى فى نطاق P متماثلة ل ١٠ مع المناطق الخاصة بها من فيرويد TPMVd، بينما ١٢ نيوكليتيده (قطعة من الخيط السفلى) من النطاق P تكون متوافقة توافقاً نموذجياً مع المناطق المشابهة لها فى كل من PSTVd و TPMVd و TASVd. إن كلا الجزأين العلوى والسفلى من المنطقة

المركزية المحفوظة في CLVd - N هي نفسها مع الأجزاء المتوافقة مع فيروس HSVd.

إن الدرجة العالية من تماثل التتابع بين الفيروسات المختلفة قد عزيت إلى خلق فيروسات مركبة عن طريق إعادة الاتحاد. وعلى أية حال فإن وجود تنابعات متطابقة في نطاقات خاصة (C، P) والنطاقين الطرفيين) من CLVd - N وفيروسات أخرى عديدة نشأت من أصول عديدة غير متعلقة مع النبات العائل الطبيعي، هذا يؤدي إلى القول بأن فيروسات حديثة نشأت من أجداد مشتركة ثم تعرضت إلى تأثيرات أدت لحدوث تطورات متقاربة.

الفصل السادس

فيروسات تحت مجموعة B₂ و B₃

أولاً : فيروسات تحت مجموعة B₂

١ - فيروسات التفاح

Apple Viroids

مقدمة:

يهاجم التفاح من قبل فيروسين هامين هما ١ - فيروس ندب الجلد في التفاح Apple Scar Skin Viroid ويكتب باختصار ASSVd ٢ - فيروس تنقط التفاح Dapple Apple Viroid ويكتب DAVd .

إن فيروس ندب الجلد في التفاح ASSVd هو العامل المسبب لمرض ندب الجلد في التفاح وهو عبارة عن جزيء RNA دائري مفرد الخيط معدى يتكون من سلسلة طولها ٣٣٠ نيوكليتيده. أما الفيروسات الأخرى القريبة له وذات حجم مشابه لحجمه وتهاجم أشجار التفاحيات فهي فيروس تنقط التفاح DAVd وفيروس الجلد الصدأ في الكمثرى Pear Rusty Skin Viroid (PRSVd). إن هذه الفيروسات الثلاثة ASSVd ، DAVd و PRSVd هامة إقتصادياً على التفاح والكمثرى في الصين واليابان، ولكن عائلها الطبيعي محدود في التفاحيات. بذلت

محاولات لنقل هذه الفيروسات إلى العوائل العشبية إلا أنها لم تنجح. طرق التشخيص الحالية لهذه الفيروسات تتضمن:-

١ - الأعراض التي تظهر على الشجرة.

٢ - تحليل الحمض النووي المعزول بواسطة طريقة RGE.

٣ - تهجين الجزيء بمنقب ASSVd cRNA معلم بالفسفور المشع.

تحتاج هذه الفيروسات إلى وقت طويل لتصل إلى مستويات يمكن اكتشافها بها في عوائلها المصابة عن طريق الأعراض. إن هذا التأخير في إظهار الأعراض الذي يحتاج تقريباً ١ - ٣ سنوات بعد الحقن لكي يمكن إظهار أعراض ASSVd و DAVd في بادرات التفاح المحقونة، ويحتاج من ٥ - ٦ سنوات حتى تظهر الأعراض في الثمار. زيادة على ذلك فإن هذه الفيروسات التي تصيب ثمار التفاحيات توجد بكميات قليلة جداً تكاد تكون آثار فقط في الأشجار المصابة ويختلف تركيزها بشكل كبير حسب اختلاف الأنسجة، هذا الاختلاف يتراوح أحياناً ما بين ١٠ - ١٠٠ ضعف.

إن سرعة تكبير (في المعمل) أجزاء من تتابعات جينوم DNA أو نسخ، هي الآن ممكنة مع تخصص عال جداً ودقة باستعمال Taq I DNA Ploymerase في تفاعل سلسلة البولي ميريز PCR. إن هذه الطريقة قد تبين بأنها ذات قيمة في تحسين التشخيص في كل من أمراض الإنسان الوراثية مثل مرض أنيميا الخلايا المنجلية وفيرس نقص المناعة في الإنسان وغيرها.

١ - مرض ندب الجلد في التفاح

Apple Scar Skin Disease

يتسبب هذا المرض عن فيروس ندب الجلد في التفاح (ASSVd) Apple Scar Viroid. ويعتبر هذا المرض شديد الخطورة على التفاح *Malus domestica*.

ويتميز بظهور لون منقط وتشقق وتشوه في الثمرة. الأعراض النموذجية تكون على شكل ندب موزعة على جلد الثمرة، إذا كانت هذه الندب كثيرة وشديدة هذا يؤدي حدوث تشقق في جلد الثمرة، إذا كثرت الشقوق وزاد عمقها تسبب تشوه الثمرة. يبدو أن المرض نادر الحدوث في الولايات المتحدة الأمريكية ولكنه واسع الانتشار ومن الأمراض الخطيرة جداً والمهلكة للتفاح في اليابان والصين. ظهر المرض في ميسوري سنة ١٩٥٦. الأعراض تظهر فقط على الثمار وبالتالي فإن الأشجار المتكاثرة عن مصدر شجرى مصاب يمكن أن يحمض على إصابتها عدة سنوات قبل أن تلاحظ أعراض المرض. وبالتالي فإنه من المهم أن تكون مصادر التكاثر خالية من المسبب المرضي ASSVd. ولسوء الحظ فإن الاختبارات البيولوجية لهذا الفيروس تتطلب إظهار الأعراض في الحقل وهذا يحتاج عدة سنوات ليكتمل، إلا أن الاختبارات الحديثة المتطورة باستعمال منقبات حمض نووي، يمكن فيها أن يكتمل الاختبار خلال بضعة أيام. هناك عدة أسباب تجعل استعمال الكواشف البيولوجية السريعة للفيروس ASSVd مفيدة وهذه الأسباب هي: -

١ - إن أماكن الاختبارات في كثير من أقطار العالم لا تكون مجهزة بأدوات استعمال منقبات حمض نووي.

٢ - إن فهرسة كواشف خشبية لا تزال مطلوبة للكشف عن كثير من الفيروسات الأخرى والعوامل المسببة المرضية الأخرى في التفاح، وإن توفر الكاشف الخشبي السريع للفيروس ASSVd يمكن أن يكون مفيد وملائم.

٣ - إن مثل هذه الكواشف يمكن أن تزودنا بتأكيدات حيوية للاختبارات المعملية.

إن الأشجار المصابة بالفيروس ASSVd من التفاح المزروع Red Delicious والنوع Stark's Earliest و Sugar Crab تعتبر كاشف لهذا الفيروس وتظهر عليها الأعراض على شكل تدلى الأواق إلى أسفل عندما تنمو في الصوب الزجاجية.

الأعراض على الثمار:

إن الثمار المتكونة على الأشجار المحقونة بالفيرويد ASSVd يتكشف عليها تشقق يبدأ بالقرب من الكأس بعد حوالي شهرين من تلقيح الأزهار (شكل ٧١). لم يلاحظ أية أعراض على الثمار من الأشجار المحقونة بالفيرس (لاستبعاد الفيرس كمسبب مرضي) ولا على الأشجار المستعملة كتنرول وخالية من الفيرويد. كثير من الأشجار التي طعمت بالبرعم والتي من المفروض أنها تحمل بدايات زهرة لم تعط أزهار نتيجة الإصابة بالفيرويد وبالتالي فإن ٧٪ فقط من الأشجار التي طعمت بالبرعم ومحقونة بالفيرويد أنتجت ثمار وجميع هذه الأشجار ظهر عليها أعراض المرض.

الأعراض على المجموع الخضرى:

الإصابة الطبيعية التي تظهر فى الحقل لا تكون إلا على الثمار، أما فى التجارب التي تجرى على النباتات الكاشفة فيمكن أن يظهر عليها أعراض على المجموع الخضرى وهى بهذه الحالة تساعد كثير جداً فى الاختبارات الحيوية، وعدم الإنتظار لسن الإنمار.

أولى الأعراض ملاحظة فى الأشجار المحقونة بالفيرويد ASSVd هو تدلى الورقة وهذا يظهر واضحاً فى أشجار الكواشف التي ذكرناها سابقاً وهى Stark's Earliest و Sugar Crab، بعد ستة إلى ثمانية أسابيع من الحقن. الأوراق الكاملة تتجدد وتلتف لأسفل مع إنحاء قمة الورقة جهة عنق الورقة وبالتالي تشكل نقطة قمة الورقة ونقطة القاعدة قطاع من شكل دائرة أو حرف C شكل ٧٢. يظهر التفاف فى الفروع الجانبية، مع إطالة مدة الحضانة يظهر مناطق ميتة متحللة على السطح السفلى للعرق الوسطى للورقة. يصعب تمييز الأعراض بين الثلاثة عزلات الخاصة بالفيرويد.

تأثير الحرارة والفترة الضوئية على حدوث وتكشف الأعراض:

إن درجات الحرارة المنخفضة وطول الفترة الضوئية تشجع حدوث وتكشف ظاهرة تدلى الأوراق وتزداد شدة المرض في الأشجار المحقونة بالفيرويد ASSVd في جميع أشجار Stark's Earliest ومعظم أشجار Sugar Crab. تظهر أعراض تدلي الورقة خلال ٥٨ يوم عندما تنمو الأشجار باستمرار تحت إضاءة وحرارة ١٨م (جدول ٤٩). أما عندما تنمو على ٢٨م تتضح الإصابة جيداً على الصنف Stark's Earliest ولكن تظهر على أعداد قليلة من Sugar Crab حيث تعبر بالأعراض المنظورة. أيضاً فإن قليلاً من الأشجار المزروعة فقط تظهر تدلى الأوراق على هذه الحرارة وتحت ١٤ ساعة إضاءة.

لم يتكشف على أى من الأشجار المحقونة أعراض تدلى الأوراق عندما نمت على ٢٨م وتحت فترة قصيرة من ساعات الإضاءة، أو على ٤ ساعات إضاءة وأى درجة حرارة (جدول ٤٩). هذه الأعراض لم تظهر على أشجار الكنترول.

يظهر بقع شاحبة ويحدث تشوه من جانب واحد على أوراق الأشجار المحقونة بالفيرويد في النوع Sugar Crab المستمر في النمو على درجة ١٨م وفترة إضاءة ٤ ساعات يومياً، وعلى أية حال فإن نفس الأعراض تلاحظ عند إصابة الأشجار بالفيروس الكامن لهذا النوع من الأشجار.

تأثير الحرارة وفترة الإضاءة على معيار ASSVd في أشجار التفاح:

لقد حصل نتيجة إيجابية للتهجين بين منقب ASSVd cRNA ومستخلصات العرق الوسيطى لحقن الورقة من أشجار تفاح نامية على ١٨ ساعة إضاءة ودرجة حرارة ٢٨م. إن تقدير المعيار النسبي للفيرويد مبنياً على كثافات إشارات التهجين في المقارنة مع المعايير الداخلية المعروفة تؤدي إلى القول بأن طول النهار له تأثير قليل أو عدم تأثير على معيار ASSVd.

يبدو أن معيار الفيرويد ينخفض على درجات الحرارة العالية. تلاحظ تفاعلات قوية في اختبارات التهجين blot - hybridization في جميع أجزاء الورقة على درج. ١٨م ولكن فقط في الأوراق الوسطية والسفلى على درجة ٢٨م. لم يلاحظ أ

تفاعلات ظاهرة ولم يحصل عليها مع نسيج من أشجار نامية على ٣٨ م. جميع عزلات ASSVd تفاعلاتها متشابهة. لم يلاحظ تفاعلات إيجابية من مستخلصات من عتق الورقة المصابة بالفيرس الكامن أو أشجار الكنترول غير المحقونة.

تأثير نوع النسيج على معيار الفيرويد ASSVd :

عينات الفيرويد المحضرة من العرق الوسطى في الأوراق وقواعد الأوراق يبدو أنها تشخيصياً أكثر دقة في اختبارات Dot - blot hybridization من التحضيرات المأخوذة من نصل الورقة وذلك لأنها تنتج تفاعلات أشد قوة. إن المستخلصات من أعناق الأوراق المصابة بالفيرويد والتي قد حدث لها تخفيف هوائي على درجة حرارة الغرفة العادية تتفاعل تقريباً بنفس القوة في اختبار Dot - blot مع منقب ASSVd cRNA كما في مستخلصات من أعناق أوراق مقطوفة حديثاً.

جدول ٤٩: تولى الورقة كتعبير للأعراض المرضية على شجرة التفاح من Stark's Earliest و Sugar Crab المحقونة بعزلة من فيروس ASSVd المأخوذة من أشجار رد دلنص المصابة بمرض لدب الجلد والفيروس تنقل التفاح وعزلة اليابانية Helya اليابانية ونامية على ظروف إضاءة وحرارة مختلفة.

طول اليوم بالمساحة	درجة الحرارة (معلوبة)	عدد الأشجار التي ظهر عليها أعراض تولى الورقة / العدد الكلى للأشجار المحقونة					
		Stark's Earliest			Sugar Crab		
		تفاح التفاح العزلة اليابانية ندب الجلد Helya			تفاح التفاح العزلة اليابانية ندب الجلد Helya		
		٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر
٢٤	٣٨	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر
	٢٨	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر
	١٨	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر
١٤	٣٨	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر
	٢٨	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر
	١٨	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر
٤	٣٨	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر
	٢٨	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر
	١٨	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر



شكل رقم ٧١ :

أعراض الإصابة بفيريوليد ASSVd على ثمرة تفاح ذات عمر ثلاثة شهور.



شكل رقم ٧٢ :

أعراض تدلى الورقة على بادرات تفاح ذات عمر شهرين محقونة بفيريوليد نذب جلد التفاح
يلاحظ في اليمين أعراض إنحناء الورقة في قمة البادرة وأختلها شكل حرف C. البادرة في
اليسار سليمة.

يتبين لنا بما سبق أن فيروسات ثمار التفاح يمكن أن تكتشف بسهولة في أقل من شهرين وذلك عن طريق حقنها في أشجار خشبية كاشفة تحت ظروف نمو متحكم بها، بالمقارنة باحتياجها إلى ٢ - ٣ سنوات إذا بقيت تحت ظروف الحقل العادية. هذه الطريقة يمكن أن تستعمل في إعطاء شهادة بأن النباتات الخشبية يمكن أن تستعمل كواشف لاكتشاف الفيروسات أيضاً. هذه النتائج يمكن أن تؤكد بواسطة اختبارات cRNA hybridization لنسيج عنق الورقة، وعلى العكس من ذلك فإن هذه الاختبارات للكشف السريع يمكن أن تزود التأكيدات البيولوجية للمرض، حيث يستعمل تكنيك اكتشاف الحمض النووي بالتهجين في المعمل.

لقد تم الحصول على الأعراض المرضية بسهولة خلال شهرين في نسيج الثمار والمجموع الخضري، وعلى أية حال فإن فائدة اختبار الثمرة قد توقف وذلك نظراً لانخفاض النسبة بين البراعم الزهرية والبراعم الخضرية المتكونة في الأشجار المحقونة بالفيروس من الصنف Stark's Earliest وكذلك بواسطة التكنيك غير الملائم للتمييز بين البراعم الزهرية والبراعم الخضرية (في الفصول الساكنة) الأكثر شيوعاً.

مع أن الكواشف للفيروس ASSVd المذكورة سابقاً لها وظيفة في الحصول السريع على معلومات تشخيصية فإن طريقة Dot - blot hybridization تتطلب وقت أقل وتسمح بالكشف عن الفيروس وتتابعاته الخاصة في مستخلص الأنسجة والذي من الصعب توقعه بالنسبة للكواشف في الأشجار الخشبية مثل الثمرة والبذرة والمجموع الخضري.

إن الأعراض المنظورة وتفاعلات التهجين لمستخلصات عنق الورقة من الأشجار المختبرة، تدل على أن معيار الفيروس ASSVd يتناقص بارتفاع درجة الحرارة خاصة بالقرب من قمة الشجرة. هذه الملاحظة تؤدي إلى القول بأن الأشجار الخالية من الفيروس يمكن الحصول عليها من أشجار مصابة تحت درجات الحرارة العالية وباستعمال طريقة تكاثر القمة (كما في فيروس اكسوكوتز الحمضيات). مع أن

الفيرويدات تميل لأن تكون متحملة كثيراً للحرارة، إلا أن هذا الفيرويد ASSVd وفيرويد اكسوكورتز الحمضيات يمكن استبعادهما من النباتات بإطالة مدة تعرضهما للحرارة ٣٨ م ثم بعد ذلك تؤخذ قمم الفروع ويجرى لها إكثار للحصول على نباتات خالية من الفيرويد. إن فيرويد ASSVd يتجمع أكثر ما يمكن على درجة حرارة ١٨ م.

لقد ثبت بأن فيرويد ASSVd يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيده وليس له علاقة بأي من الفيرويدات الأخرى.

ب - عرض تنقر التفاح

Dapple Apple Disease

إن مرض تنقر التفاح هو مرض مشوه للثمرة كان أول وصف له سنة ١٩٥٦ في مزارع التفاح في مقاطعة نيوهام بشير New Hampshire ووصف في كوليبيا سنة ١٩٦١. يظهر المرض على شكل نقر مختلفة المساحة على الثمرة وقد تأخذ شكل يقع كبيرة وتشوه الثمرة إذا كان الفيرويد المسبب مقترناً مع فيرويد ASSVd. أعراض المرض واضحة لا لبس فيها إذ تكون التنقرات ذات لون مختلف قليلاً عن لون جلد الثمرة وتكون النقر متوزعة على سطح الثمرة، قد يحدث التباس مع مرض النقرة المرة في التفاح المسبب عن حالة فسيولوجية مثل نقص الكالسيوم والاضطرابات المائية في التربة، إلا أن مرض النقرة المرة يجعل جلد الثمرة مثل جلد وجه الإنسان الذي أصابه جدري وشفى منه (في المراحل الأخيرة من إصابة لمار التفاح).

تبين أن مسبب المرض ينتقل بالتطعيم وذلك منذ سنة ١٩٥٨. المرض ينتشر في كندا، اليابان، بريطانيا، وإيطاليا. ولقد ذكر أنه قريب الشبه مع مرض ندب الجلد في التفاح. ولقد ذكر وصف لهذا المرض في كل من الولايات المتحدة والصين

واليابان. إن المدى العائلي لهذا المرض محدود فى أشجار التفاحيات. متوسط الوقت الذى يلزم للتعريف السليم لهذا المرض بواسطة الأعراض على الثمار عند تطعيم الأشجار الخشبية التى تستعمل كاشف للمرض هو ثلاثة سنوات.

مسبب المرض:

يتسبب هذا المرض عن فيروس تنقر التفاح (DAVd) Dapple Apple Viroid وهو يتكون من حوالى ٣٣٨ نيوكليتيده (لم يتأكد الرقم بعد). لقد تبين وجود نوعين من RNA لهما وزن جزيئى منخفض مترافق مع الأحماض النووية المستخلصة من الثمرة المصابة بمرض ندب الجلد أو من نسيج القلف ولكن ليس من الأنسجة السليمة وإن RNA الأصغر دائرى. إن حقن بادرات التفاح بالحمض النووى الكلى غير المجرأ المأخوذ من نسيج مريض تبين أنه يحتوى RNA ذو حركة فى الهمجرة الكهربائية تشبه الحمضين المرافقين للمرض من RNAs.

ولقد تبين أن الأحماض النووية المعزولة من أنسجة التفاح المريضة بمرض تنقر التفاح فى شمال أمريكا أعطت نتائج إيجابية مع منقب ASSVd cRNA وأن فيروس تنقر التفاح (DAVd) ينتشر جهازياً فى بذور التفاح وفى الثمرة والقلف والورقة وفى أنسجة الجذر. إن أفضل طريقة سريعة لاكتشاف الفيروس هى منقب ASSVd cRNA generated SP6 وهذه الطريقة تكشف أيضاً عن فيروس ASSVd فى الأحماض النووية المستخلصة من النسيج المصاب.

من الدراسات الحديثة التى أجريت على فيروس تنقر التفاح فى كل من أمريكا وكندا، تبين أنه فيروس له تماثل تام وشديد التشابه مع فيروس ندب الجلد فى التفاح المنتشر فى اليابان وهناك عدة إثباتات تدل على التطابق التام بين فيروس DAVd وفيروس ASSVd وهذه الإثباتات هى:

- ١ - إن ASSVd cRNA المعلم بالفسفور المشع يتجهن مع RNA من نسيج مصاب بالفيروس DAVd وليس مع RNA من نسيج غير مصاب.

٢ - يحصل على إشارات قوية من التهجين مع RNA من الأنسجة المصابة في أمريكا وكندا لمرض تنقر التفاح.

٣ - استعمال RNase بطريقة معينة يزيل الهجن التي حصل لها تزاوج غير ملائم.

٤ - RNA المهجن يكون بشكل أساسي موزع في جزيئات محلول كلوريد الليثيوم والذي يميز الفيريونات.

٥ - إن مقارنة الحركة في الهجرة الكهربائية للفيريود DAVd مع فيريود PSTVd يؤدي إلى القول بأن الفيريود DAVd يتكون من نيوكليتيديات أقل بحمية بسيطة عن ٣٥٩ نيوكليتيدي، هذا الحجم يكون متكامل مع حجم فيريود ASSVd الذي يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيدي.

٦ - إن كل من ASSVd و DAVd ينتشر جهازياً في أشجار التفاح المصابة جدول ٥٠.

إن تحليل فيريود DAVd بطريقة Return gel electrophoresis يمكن أن تستعمل لكل من DAVd أو ASSVd من حيث التنقية والكشف والدراسات الأخرى. ويبدو من المعقول أن هناك سلالة من ASSVd تكون مرافقة لمرض تنقر التفاح في شمال أمريكا.

الطريقة المفضلة لاكتشاف DAVd هي طريقة الكشف بالتهجين الجزيئي والتي تسمى Molecular hybridization detection method بالإضافة إلى الطرق البيولوجية، ولهذه الطريقة فوائد منها:-

١ - يتطلب التعريف الموجب للمرض بضعة أيام للعمل على النسيج المصاب، بالمقارنة نحتاج إلى أكثر من ثلاثة سنوات لاكتشاف الفيريود بالطريقة البيولوجية.

٢ - يمكن استعمال أنسجة مأخوذة من الورقة، القلف، الجذر، البذرة و / أو نسيج الثمرة في هذه الطريقة أما في طرق الكشف الحيوية فإن ثمار التفاح فقط هي التي تستعمل في التشخيص.

٣ - إختبار cRNA دقيق ومتخصص وحساس جداً، وبالمقابل فإن أعراض الفيرويد ASSVd أو DAVd على ثمار التفاح تختلف بشكل كبير بين الأصناف المزروعة والمستعملة للكشف وتعتمد على ميتابولزم مركبات المواد الفينولية في الثمرة. بالإضافة إلى هذه الصعوبات في الإختبارات الحيوية فإن وجود بعض فيروسات التفاح والعوامل المسببة تشوه الثمرة يمكن أن تجعل تشخيص هذا المرض المبني على أعراض الثمرة فقط، غير دقيق.

٤ - إن إختبار cRNA يكون غير مكلف نسبياً ولا يحتاج إلى مساحات كبيرة، بينما الإختبارات البيولوجية مكلفة وتحتاج معامل ومساحات أكبر.

إن اكتشاف الفيرويد ASSVd أو DAVd في بذرة التفاح والأنسجة الخضرية يؤدي إلى القول بأن الفيرويد يمكن أن ينتقل خلال هذه الأنسجة. إن النقل بالأجزاء الخضرية وبالبذور يمكن أن يكون مخاطرة صعبة بسبب أن الفيرويد يمكن أن ينتقل من الأصل الجذري للتفاح النامي من بذرة مصابة أو أنسجة خضرية إلى أنواع القلم المستعملة بالتطعيم. وبسبب أن DAVd أو ASSVd ينتشر جهازياً في أشجار التفاح المصابة، فمن المحتمل أن ينتقل إلى المزارع عن طريق أدوات التقليم والتطعيم الطبيعي للجذر.

ولقد وجد في بعض التجارب أن مستخلصات الحمض النووي من نوع تفاح آسيوى أعطت إختبار موجب مع منقب cRNA ASSVd المعلم بالفسفور المشع. إن الفيرويد ASSVd والفيرويد DAVd تستطيع أن تهاجم هذا النوع من التفاح الآسيوى بالإضافة إلى كثير من الأنواع الآسيوية الأخرى بدون أن تسبب أعراض

مرئية في ثمارها. هذه الفيرويدات مجتمعة تستطيع أن تسبب ندب الجلد وتقرح وتشقق الشمار عندما تصيب مجموعة أصناف التفاح الأمريكية مثل رد دلشس وماكتوش. وبالتالي عن طريق استعمال هذا الاختبار فإن أصناف التفاح الغريبة يمكن أن تنفي بسرعة أكثر عند دخولها إلى أمريكا.

إن توفر منقبات عالية التخصص من ASSVd cRNA مع إجراءات استخلاص الحمض النووي واختبارات التهجين تجعل هناك مراقبة على الانتشار العالمي للمرض بين المتسبين عن الفيروسين ASSVd و DAVd.

اكتشاف الفيروسات ASSVd و DAVd في مكونات البذرة والبراعم:

نتيجة التحليل للأحماض النووية بواسطة Northern blot hybridization للمستخلصات من أنسجة الثمار والبذور من أشجار التفاح المصابة طبيعياً وغير المصابة، كان هناك نتائج إيجابية لإشارات التهجين حصل عليها من جلد الثمرة ولحمها بالإضافة إلى البذور في الثمار المصابة بفيرويد ندب الجلد. النتيجة الإيجابية لإشارات التهجين حصل عليها دائماً من الأحماض النووية من البذور في جميع أصناف التفاح المزروعة والمصابة بالفيرويد ASSLVd، DAVd والمظهر أعراض، بالإضافة إلى البذور المأخوذة من أصناف الكمثرى المصابة بفيرويد ASSLVd.

جدول ٥٠: اكتشاف فيروس DAV أو ASSVd من أنواع الطحاح الآسيوي ومن أنواع تفاح محلية في أمريكا عن طريق التفتيش الجزيئي مع SP6 مولد مثاقب ASSVd cRNA معطى بالمسطور المشع.

مصدر الأحماض النورية	نوع أسوي ١	نوع أسوي ٢ - ٢٤	أحجار مصابة باليوريد تتفر التفتح واحد	أحجار مصابة باليوريد تتفر التفتح نوع ٢	أحجار مصابة باليوريد ASSV	أحجار كاتيون
الأوراق	+	-	+	+	+	-
أوراق قديمة	+	+	+	+	+	-
قلف	+	+	+	+	+	-
أوراق حديثة جداً	+	+	+	+	+	-
جذور	+	+	+	+	+	-

المحسّن النوى الكلى ٧٥ - ١٠٠ ميكروغرام / عت، حلت بطريقة Dot blot hybridization وطريقة Northern blot hybridization. (+) تفاعل
 إيجابي موجب، (-) تفاعل إيجابي سالب.

ولقد ثبت أن الفيرويديين موجودان في أغلفة البذرة وتحت الغلاف البذري والفلقات والأجنة وكذلك في جميع مكونات البذرة. إن نسبة الفيرويدات في غلاف البذرة وتحت الغلاف أكثر منه في الفلقات والأجنة، وباستثناء حبوب اللقاح فإن جمع أجزاء الزهرة تحتوي فيرويد.

لاكتشاف الفيرويد في البرعم الخشبي، يؤخذ القلم (الطعم) المصاب بالفيرويد DAVd ويطعم على أصل تفاح ذو عمر سنة في بداية الخريف (أول سبتمبر) أو في أوائل الربيع من السنة القادمة، إما أن تزال قمم الأصل المطعم من فوق منطقة التحام الأصل بالطعم وذلك لإعطاء قوة للطعم لينمو إلى فروع جانبية محتوية DAVd المتناسخ أو أن تترك بدون إزالة وبالتالي فإن الفيرويد DAVd سوف يصيب الأصل النامي. تفحص نموات الطعم ونموات الأصل على فترات لاكتشاف DAVd بواسطة طريقة Northern blot hybridization. بعد شهرين يؤخذ عينة من قلف ونسج ورقة من جميع الفروع النامية من القلم المطعم وتختبر. وجد أن جميع النموات الناتجة من القلم المطعم فيها فيرويد DAVd، ولكن الفروع النامية من الأصل لا يوجد فيها فيرويد أما عند إجراء الاختبار بعد أربعة شهور أخرى وجد ٢٥٪ إصابة في هذه الأجزاء وتزداد هذه النسبة كلما تقدم الزمن وبعد سنتين بالتمام وجد الفيرويد في جميع أجزاء الأصل، أي أن الأصل وجميع فروع الطعم أصبحت محتوية فيرويد DAVd.

بناءً على ما تقدم نستطيع أن نقول إن فيرويد ASSVd وفيرويد DAVd هي فيرويدات كامنة في البذور وبالتالي فهي أكثر ميلاً لأن تنتقل بالبذور (إلا أن هذا لم يثبت بعد بالتجربة). مع أن ثمار أشجار التفاحيات تصاب بكثير من الفيرويدات وعوامل شبيهة بالفيرس، إلا أنه لم يثبت لأي من هذه الممرضات بأنه كامن في بذور التفاح والكمثرى باستثناء العامل المسبب مرض اصفرار العروق في الكمثرى. وبالتالي يمكن القول بأن كل من ASSVd و DAVd هما أول العوامل الممرضة الفيرويدية قد عرفا بأنهما يتواجدان في بذور ثمار التفاح.

إن اكتشاف هذين الفيرويديين فى بذور العائل يشبه اكتشاف فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس PSTVd فى بذور البطاطس الحقيقية، إلا أن إنتشار فيرويد PSTVd فى مكونات البذور المصابة لم يحدد تماماً. إن ارتفاع نسبة وجود كل من ASSVd و DAVd فى أغلفة البذور وتحت الغلاف يؤدى إلى القول بأن معظم جزيئات الفيرويد فى البذور المصابة يبدأ من تناسخ الفيرويد فى بويضات الزهرة. كذلك فإن اكتشاف كميات قليلة جداً من الفيرويد فى أجنة البلور المصابة يؤدى إلى القول بأن الفيرويدات الموجودة فى الجنين يمكن أن تكون قد نشأت من المبيض ولو من ناحية نظرية لغاية الآن.

كذلك فإن عدم وجود الفيرويد فى حبة اللقاح، هذا يعنى أن الفيرويد لا ينتقل عن طريق حبوب اللقاح كما أنه لا يتمركز فى حبوب اللقاح. وإن وجود الفيرويد ASSVd أو DAVd فى الأشجار المنتجة لثمار من التفاحيات على الأقل لمدة ستين متتابعين بالإضافة لاكتشاف الفيرويد DAVd فى البادرات المصابة باستمرار لعدة سنوات من بعد اكتشافه الأولى، يؤدى إلى القول بأن هذه الفيرويدات دائمة فى الأنسجة المصابة ونظراً لأن الفيرويديين كامنين فى البذور وبالإضافة إلى احتمالية إنتقالهما بالبذور بالإضافة إلى استمراريتهما فى النسيج المصاب، كل ذلك يجعل فهرسة ثمار التفاحيات ضرورية لمعرفة إصابتها بالفيرويديين، مع أنه فى السابق كان ينظر إلى ثمار التفاح بأنها خالية من الفيروس والفيرويد.

لفهرسة البرعم الخشبي budwood للفيرويديين ASSVd أو DAVd يمكن أن يتم ذلك عن طريق إتخاذ الطرق البيولوجية والجزيئية. يجب أن يجرى الحقن بالبرعم أو التطعيم بالقلم فى الخريف أو الربيع ويسمح له بالنمو وذلك لزيادة معيار الفيرويد فى النسيج المصاب ثم بعد ذلك تفحص أنسجة القلف أو ورقة من البرعم النامى لاكتشاف الفيرويد بطريقة التهجين الجزيئى لمستخلص الحمض النووى بـ ASSVd cRNA المعلم بالفسفور المشع. ويسبب أن ASSVd و DAVd دائمة

الوجود فى الأجزاء النباتية المصابة ولأنها منتشرة جهازياً فى النسيج المصاب فإن الاختبارات السابقة الذكر يمكن أن تجرى على نسيج مجموع من نموات فصل النمو الأول ثم على ما بعد ذلك من نموات.

جـ- عرض تغضن ثمرة التفاح

Apple Fruit Crinkle Disease

يتسبب هذا المرض عن فيروس يسمى فيروس تغضن ثمرة التفاح Apple Fruit Crinkle Viroid ويكتب (AFCVd). لغاية سنة ١٩٩٤ لم يذكر أن المرض ينتشر خارج اليابان. تظهر أعراض المرض على شكل تغضن فى جلد الثمرة وتبدو وكأنها تميل إلى شئ من التكرمش إذا كانت الإصابة شديدة. ينتقل هذا المرض بالتطعيم. للفيروس حجم جزئى أكبر من حجم فيروس ندب الجلد فى التفاح ويقارب من حجم فيروس تنقر ثمار التفاح. الأبحاث الأولية أعطت لهذا الفيروس رقم ٣٤٠ نيوكليتيده إلا أن هذا الرقم تقريبى ولم يتأكد بعد. إن فيروس AFCVd لا يتجهن مع ASSVd cDNA. يمكن نقل الفيروس إلى بادرات التفاح بواسطة Electro Pho- Retically Purified Preparations طريقة Razer - Slash. إن هذا الفيروس يتميز فى جميع صفاته عن فيروسى التفاح ASSVd و DAVd.

٢- فيروسات الكمثرى

Pear Viroids

تصاب أشجار الكمثرى *Pyrus communis* بثلاثة فيروسات مختلفة وهى :-

- 1 - Pear Blister Canker Viroid = (PBCVd)
- 2 - Pear Rusty Skin Viroid = (PRSVd)
- 3 - Apple Scar Skin latent Viroid = (ASSLVd)

الفيروس الذي استطعنا أن نتحصل على معلومات عنه هو الفيروس الأول، أما الفيروس الثانى والثالث فلم أستطع الحصول على ما يكفى من معلومات لتوضع فى هذا الكتاب إما لقلة الأبحاث وإما لقصور منى وإما لكليهما معاً.

مرض البثرة المتقرحة فى الكمثرى

Pear Blister Canker Disease

مقدمة:

هناك أمراض كثيرة تسبب تشوهات واضطرابات فى قلف أشجار الكمثرى وصفت فى أوروبا وأمريكا، ومن ضمن هذه الأمراض، مرض البثرة المتقرحة فى الكمثرى الذى وصف سنة ١٩٦٠، ومرض القلف الخشن فى الكمثرى الذى وصف سنة ١٩٥٧، مرض تشقق ونكروز اللحاء فى الكمثرى الذى وصف سنة ١٩٦٥ و ١٩٦٧ ومرض جدري القلف measles الذى وصف سنة ١٩٦١. ولقد ذكر أن حوالى 7٥ من الكمثرى المزروعة فى أوروبا تحمل أى من هذه الأمراض، وكثير من الأصناف تكون حاملة للمرض بدون إظهار أعراض إما أن تكون Carrier أو Tolerant.

من المفترض أن جميع هذه الأمراض تتسبب عن فيروسات ولكن نتيجة الأبحاث تبين أن بعض هذه العوامل المسببة متحملة للحرارة يعنى لا يمكن استبعاد المسبب بالحرارة، ونظراً لأن الفيروسات أقل تحملاً للحرارة من الفيروسات وبالتالي اعتبرت هذه الأمراض متسببة عن فيروسات، هذا من ناحية منطقية فقط ولا بد من إجراء طرق الكشف كلها بعد ذلك لإثبات ما يقال.

أعراض المرض:

يظهر المرض على شكل بثرات صغيرة على قلف الساق، تزداد فى العدد والحجم وتتكشف إلى تشققات فى بداية الربيع، تظهر الأعراض على بادرات الكمثرى ذات عمر سنتين، إذا كانت الإصابة شديدة يمكن أن تموت البادرات أو الأغصان أو كليهما معاً. الأشجار التى تبقى حية وعليها إصابة ينخفض إنتاجها من

الثمار عنه في الحالة الطبيعية. إذا كانت الإصابة خفيفة تكون الأعراض قليلة أقل من أن تقشر القلف وتصلبه، وإذا كانت الإصابة شديدة تظهر الأعراض على شكل تقشر القلف بشكل كبير وهذا العرض يحدث التباس مع أعراض الإصابة الفطرية.

تظهر الأعراض على الساق فقط أما الثمار والأوراق فلا يظهر عليها أية أعراض. تبدأ الأعراض في الظهور في السنة الثانية بتشققات خارجية على سطح القلف وفي الأبيدوم ثم بعد ذلك تتحول إلى تشققات كثيرة ومنتشرة على الساق شكل ٧٣. تتعمق التشققات حتى تكاد تسبب في سقوط مساحات من القلف وقد تسبب موت الشجرة أحياناً أو ينخفض نموها وتعيش لمدة قصيرة.

أهم الأنواع والتي هي حساسة وكاشفة لهذا المرض هي أشجار الكمثرى *Pyrus communis* A. 20 حيث تظهر الأعراض النموذجية على هذا الصنف وتتميز بأن تكون على شكل قشور.



شكل رقم ٧٣:

أعراض الإصابة بفيروس PBCVd . البثرة المتقرحة في قلف الكمثرى.

مسبب المرض:

يتسبب هذا المرض عن فيروس يدعى Pear Blister Canker Vir (PBCVd) oid. شكل ٧٤ يبين التركيب الثانوي لهذا الفيروس. إن فيروس PBCVd هو RNA دائري يتكون من ٣١٥ نيوكليوتيد. وتركيبه العام يتكون من ٩٩ قاعدة G (حوالي ٤,٣١٪) و ٩٢ قاعدة C (٢,٢٩٪) و ٥٤ قاعدة A (١,١٧٪) و ٧٠ قاعدة U (٢,٢٢٪)، وبالتالي فإن محتوياته من G + C حوالي ٦٠,٦٪ مشابهاً بذلك الفيروسات الأخرى باستثناء فيروس ضربة الشمس في الأفوكادو ASBVd. وكذلك فإن هذا الفيروس مثل بقية الفيروسات الأخرى لا يعمل تشفير لأي بروتينات.

إن التركيب الثانوي الأكثر ثباتاً لفيروس PBCVd هو الشكل المتفرع مع طاقة حرة 365.7 KJ / md - إن الفحص للتركيبات البديلة ضمن ١٠٪ من قيمة أقل طاقة حرة أظهرت أنه لا يوجد للفيروس شكل شبه عصوي.

في التركيب الثانوي المفترض لهذا الفيروس فإن ٦٧,٦٪ من نيوكليوتيداته هي أزواج وأن نسبة GC ٦٤,٤٪ و AU ٢٢,٤٪ و GU ١٣,٢٪. كذلك فإن هذا الفيروس يحتوى تتابع CCR والذي يميز أفراد تحت مجموعة B₂ والتي يطلق عليها اسم apscaviroids (تعني مجموعة فيروس ندب الجلد في التفاح ASSVd) وهذا الاصطلاح وضعه Blena سنة ١٩٩١ ليجمع الفيروسات التي تشابه فيروس ندب الجلد في التفاح في معظم صفاتها في مجموعة واحدة سماها apscaviroids وهذه المجموعة ذكرناها في التصنيف في الجزء الأول من الكتاب بأنها تحت مجموعة B₂. أما الفيروسات التي تشابه فيروس الدرة المغزلية في البطاطس فسموها مجموعة Pospiviroids وذكرنا اسمها في الجزء الأول من الكتاب تحت مجموعة B₁.

من التركيب السابق لفيروس PBCVd يتبين عدم وجود U الموجودة على نهاية 3' من CCR في الخيط السفلي من الخمسة فيروسات الأخرى التي تمثل تحت مجموعة B₂ (apscaviroids) وهي: -

ASSVd = Apple Scar Skin Viroid

GYSVd = Grapevine Yellow Speckle Viroid

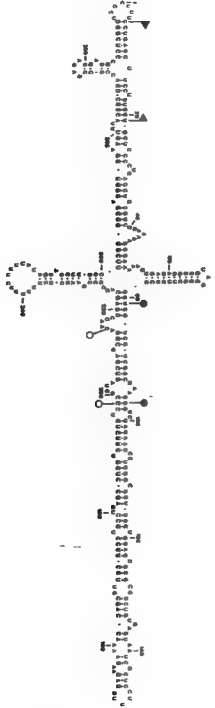
G1BVd = Grapevine 1B Viroid

AGVd = Australian Grapevine Viroid

CBLVd = Citrus Bent Leaf Viroid

إن تتابع الفيرويد PBCVd منطبق مع الخيط العلوى من حيث CCR وإن ١٢ مركز المحيطية الجانبية على أى جانب والذي يمثل مجموع ٤٠ نيوكليوتيدة عندها المقدرة لتشكيل تركيب متعكس Palindromic مع إما نفس التتابع من جزئ آخر من PBCVd أو من منطقة أخرى multimeric لجزئ الفيرويد، هذا التتابع لأربعين قاعدة يستطيع أن ينشئ ويشكل تركيب عروة. كلا الصنفين من التركيب ذكرت لأفراد أخرى من apscaviroids، بالإضافة إلى تحت مجموعة الفيرويدات التى يمثلها PSTVd (Pospiviroids) مثل CCVd (Cocaviroid) و hop stunt viroid و 1 و Coleus blumei (Cb1Vd)، ولقد افترض على أنها تلعب دوراً فى تجهيز ومسطات الفيرويد Oligomeric بالإضافة إلى الخيط العلوى والسفلى فإن منطقة CCR فى الفيرويد PBCVd تستطيع بكفاءة أن تتخذ شكل صليبي كما فى بعض أفراد apscaviroids شكل ٧٤.

كذلك فإن الفيرويد PBCVd له منطقة حفظ طرفية-(Terminal Con (TCR) served region تبدأ من موقع ٥ إلى ٢١ وتتكون من CCUGAGGUUCCUGUGGU وهذه المنطقة محفوظة فى جميع أفراد apscaviroids و pospiviroids فى مواقع مشابهة. كذلك فإن هذا الفيرويد كما فى بقية الفيرويدات النموذجية غنى بتتابع الأدينين Adenine فهو من هذه الناحية يتضمن ١٣ مركز من ضمنها ١٠ ادينين بين موقعي ٤٢ و ٤٥ وهو كذلك غنى فى تتابع اليوراسيل Uracil ففيه ١١ قاعدة يوراسيل فى موضعى ٢٣٧ و ٢٤٧.



شكل رقم ٧٤ :

التركيب الثانوي المتوقع لفيروس PBCVd. منطقة TCR محددة بالإعلام ومنطقة CCR في
الخط العلوي محددة بدوائر سوداء أما في الخط السفلي محددة بدوائر غير مظلومة.

مقارنة فيروس PBCVd مع فيروسات أخرى:

يتميز فيروس PBCVd بأن فيه تماثل تتابع كلي عال متشابه مع فيروس GIBVd و CBLVd. (٥٢,٤٪ للأول و ٥٠,٦٪ للثاني). إن التشابه بين هذا الفيروس وبين الفيروسات الأخرى يتضمن بالإضافة إلى ال ٣٣ موقع النموذجي من CCR العلوية والسفلية الموجودة في جميع أفراد تحت مجموعة ASSVd و ١٢ موقع في TCR فإن هناك تتابعات أخرى عديدة متوزعة بطريقة سمتية على نفس الخط في هذه الفيروسات. كذلك فإن فيروس PBCVd يحوى أيضاً مناطق والتي هي ذات علاقة للتتابع الموجود في الفيروسات الأخرى. هذه العلاقة التتابعية تدل على أن فيروس PBCVd له تركيب معين يتكون من تتابع فريد عن الفيروسات التي تنتمي إلى تحت مجموعات الفيروسات الأخرى. إن الجزء الأيسر من هذا الفيروس يماثل فيروسات تحت مجموعة فيروس الدرة المغزلية في البطاطس، بينما الجزء الأيمن يشمل منطقة CCR فيه مناطق تشابه تلك الموجودة في فيروسات تحت مجموعة B₂. هناك إمتدادات قصيرة من المراكز تقع بين مركز ١٦٦ و ٢٥٧ تظهر تماثل متطابق مع ASBVd و فيروس CTIVd و PLMVd.

الصفات العامة للفيروس:

إن تتابع النيوكليوتيدات الكامل للفيروس PBCVd يبين أنه جزئ دائري يمتلك عناصر تركيبية مشتركة مع الفيروسات النموذجية الأخرى، إنه يحوى CCR مشابه لما هو في مجموعة apscaviroids ولكن يفتقر إلى النهاية الطرفية 3' التي فيها U في الخيط السفلى والموجودة في الأفراد الأخرى من تحت هذه المجموعة. وبالتالي فإن التتابع المحفوظ من ال CCR في تحت مجموعة apscaviroids تنخفض إلى ٣٣ موقع من النيوكليوتيدات، ١٦ منها متعلق بالخيط العلوى و ١٧ للخيط السفلى. كذلك فإن الفيروس PBCVd يحوى ال TCR الموجودة في تحت مجموعة pospiviroids وتحت مجموعة apscaviroids ومنطقة غنية بالادين في الموقع العادى على الجانب الأيسر من الخيط العلوى. وعلى أية حال فإن هذه

المنطقة الأخيرة ليست أزواج قواعد مع التابع الغنى باليوراسيل الموجود في الخيط المقابل في التركيب الثنائي للفيرويد PBCVd من موقع ٢٣٧ إلى ٢٤٧ بالمقارنة مع تلك الموجودة في الفيرويدات النموذجية.

إن الصفة الغريبة لهذا الفيرويد هي عدم وجود تنوعات تتابع له. إن هذه الظاهرة تتكرر في حالات معينة مع الفيرويدات التي تخضع لعمليات تصفية في العائل، في هذه الحالة يمكن أن تختفى ظاهرة تنوعات التابع، أما هنا فلا يخضع الفيرويد لمثل هذه التصفية وبالتالي فإن هذه الصفة متأصلة فيه. إن تماثل التتابل الملاحظ في PBCVd يمكن أن يكون دلالة على تركيب قوى أو / و وظيفة إجبارية. إن شرح التتابعات الإضافية الموجودة في عزلات أخرى للفيرويد PBCVd والتي تحدث تفاعل مشابه في شجرة الكمثرى الكاشفة A20 ستساعد في توضيح هذا السؤال مستقبلاً إن شاء الله.

ونظراً لأن الأجزاء المختلفة من PBCVd أيضاً تظهر تماثل ملحوظ مع فيرويدات من تحت مجموعات أخرى يؤدي إلى القول بأن هذا الفيرويد قد نشأ عن طريق إعادة الاتحاد في RNA، هذه الاحتمالية قد فرضت للفيرويدات الأخرى. في غالبية الحالات فإن إعادة الاتحاد يبدو أنها تتدخل في تغيير قطع بين الفيرويدات التي تتبع إما لنفس تحت المجموعة أو لأخرى قريبة العلاقة بها. وعلى أية حال فإن إعادة الاتحاد بين الفيرويدات من تحت المجموعات المختلفة ملاحظة بشكل خاص في بعض أفراد apscaviords. إن العائل المتعاون في دعم تناسخ الفيرويدات المختلفة يمكن أن يسمح في تغيير RNA. وقد ذكر في هذا المجال ما يحدث في الكمثرى من عزلة فيرويد pear - HSVd وفيرويديين آخرين مشابهين في الحجم والتتابع للفيرويد ASSVd. وعلى أية حال فإن PBCVd يبدو أنه قد نشأ بواسطة إعادة الاتحاد بين هذه الفيرويدات، بالإضافة إلى عوائل مختلفة من الكمثرى تخدم كوسيط إحتياطي لفيرويدات مميزة وتسمح بحدوث إعادة الاتحاد بينها.

أخيراً فإن التركيب الثانوى المتفرع على أقل طاقة حرة متحصل عليها للفيروس PBCVd تدل على أن هذا الفيروس لا يتطابق مع التركيب شبه العصى. إن هذا الوضع ليس فريداً للفيروس PBCVd بل يمكن أن يحدث هذا الشئ لأفراد كثيرة من تحت مجموعة apscaviroids حيث أنها تحدث شكل متفرع باستثناء AGVd تحت ظروف معينة. إن تكوين الشكل المتفرع قد إفترض أيضاً لكثير من الفيروسات من ضمنها ASBVd وفيروس تقزم قمة الطماطم TASVd وفيروس PLMVd وغيرها.

العوائل المشخصة:

إن طريقة PAGE وطريقة Northern blotting ذات فائدة كبيرة فى سرعة اكتشاف الفيروس، بينما فى النباتات الكاشفة يحتاج الفيروس إلى يومين حتى ينتقل من اللقاح إلى النبات. مع أن نبات الخيار يستطيع أن يبقى ويساند تكاثر الفيروس PBCVd إلا أنه ليس عامل مشخص جيد لأنه لا يتفاعل ويعطى أعراض واضحة مع الفيروس. إلا أن العائل المشخص هو ما ذكر فى أول هذا الموضوع وهو الكمثر *Pyrus communis* A20. وجد أن الفيروس لا يتكاثر فى *Gynura* ولا فى الطماطم ولا الأقحوان.

للفيروس ثلاثة عزلات متماثلة هى P1914T، P2098T و P49T.

٣- فيرويدات العنب

Grapevine Viroids

مقدمة:

هناك عدة فيرويدات وكائنات أخرى شبيهة بالفيرويدات ذكر بأنها تهاجم أصناف العنب والأصول النباتية التي يطعم عليها العنب. وإن عمليات الحصر التي تؤدي إلى تقدير إنتشار هذه المسببات المرضية خلال مدى واسع من المصادر المدروسة جيداً أظهر بأن الفيرويدات موجودة في جميع النباتات المختبرة في استراليا، فقط بعض البادرات تبين أنها خالية من الفيرويدات وهذا يرجع لعدم إنتشار الفيرويد خلال البلور.

إن هذا الإنتشار الواسع لجزيئات الفيرويد من المحتمل أن يكون نتيجة لعدة عوامل والتي تعرف بأنها مناسبة لانتقال الفيرويد والعوامل المرضية الشبيهة بالفيرويد وهذه العوامل تشمل التكاثر الخضري المستمر للعنب على زمن طويل وأجيال متتابة، الاستعمال المستمر للأصول ذات الكفاءة العالية والتي هي مصابة بالفيرويد، استعمال المواد النباتية بطريقة غير صحيحة وإحتمالية الانتقال الميكانيكى عن طريق الأدوات الزراعية خلال التقليم والجمع.

تعرض شجيرات العنب *Vitis vinifera* للإصابة بالعديد من الأمراض تظهر هذه الأمراض على شكل التفاف الأوراق، تبرقش الأوراق، تفلن القلف وتنفق الخشب، النقط الصفراء. تنتشر هذه الأمراض فى معظم زراعات العنب فى العالم وتسبب خسائر إقتصادية هامة. كانت تعزى هذه الأمراض إلى مسببات فيروسية وذلك

بالاعتماد على طرق نقلها وبسبب الأعراض التي تحدثها وتشبه تلك المتسببة عن فيروسات. بعد الدراسات العديدة تبين أن مسببات هذه الأمراض هي فيروسات.

إن أول التقارير التي كانت تشير إلى وجود الفيروسات في العنب كانت سنة ١٩٨٤، حيث ذكر العالم Sano et al في اليابان أنه أمكن عزل فيروسات من العنب. كذلك سنة ١٩٨٥ ذكر Flores et al في أسبانيا أن كثير من نباتات العنب مصابة بالفيروس وقد أمكنه عزل بعض الفيروسات من العنب وفي سنة ١٩٨٦ ذكر في كاليفورنيا ظهور أعراض مرضية بالفيروس في نباتات العنب. بعد ذلك إنتشرت الدراسات على فيروسات العنب.

لقد أجريت دراسات عديدة على فيروسات العنب واكتشفت فيروسات عديدة في مناطق جغرافية مختلفة وكان يعطى لهذه الفيروسات أسماء مختلفة حتى أن الفيروس الواحد في منطقتين مختلفتين يعطى اسمين مختلفين. إن إنتشار الأبحاث وكثرة اكتشاف فيروسات على العنب جعل من الصعوبة بمكان حصر هذه الفيروسات مع كثرة هذه المسميات، مما حدى بالمؤتمر الدولي العاشر لدراسة الأمراض الفيروسية والأمراض الشبيهة بالفيروس على العنب المسمى International Council For The Study of Viruses And Virus - Like Diseases of The Grapevines (ICVG) المنعقد في اليونان سنة ١٩٩١ وكذلك المؤتمر الدولي لدراسة الفيروسات (ICTV) International Committee On Taxonomy of Viruses سنة ١٩٩٢ بتحليل أسماء الفيروسات التي تصيب العنب في خمسة أنواع، بغض النظر عن جميع الأسماء السابقة أو الأماكن الجغرافية التي اكتشفت فيها والأسماء هي:-

١ - مجموعة الفيروسات التي هي عزلات من فيروس اكسوكورتز الحمضيات ويرمز لها - CEVd-g

٢ - مجموعة الفيروسات التي هي عزلات من فيروس تقزم حشيشة الدينار ويرمز لها - HSVd-g

٣ - مجموعة الفيروسات التي تسبب العنب الاسترالي وتكتب AGVd

٤ - مجموعة الفيروسات التي تسبب مرض النقطة الصفراء فى العنب Yellow Speckle وهى تسبب أمراض واضحة على العنب وتكون من فيروسين:-

أ - فيروس النقطة الصفراء فى العنب رقم ١ ويكتب باختصار GYSVd - 1

ب - فيروس النقطة الصفراء فى العنب رقم ٢ ويكتب باختصار GYSVd - 2

المجموعة الأولى يمثلها فيروس واحد هو فيروس اكسوكورتز الحمضيات عزلة العنب g - CEVd وكذلك المجموعة الثانية يمثلها فيروس تقزم حشيشة الدبنار عزلة العنب g - HSVd. إن هذين الفيروسين لم يذكر أنهما يسببان أعراض واضحة على العنب ولكنها تعزل من العنب المصاب بالأمراض.

كذلك فإن المجموعة الثالثة لا تسبب أعراض واضحة على العنب وهى عبارة عن فيروس منتشر فى استراليا بشكل كبير وهو يعزل من جميع نباتات العنب التي يظهر عليها أعراض مرضية. هناك محاولة من بعض العلماء بإضافة فيروس آخر لهذه المجموعة يعزل من الخيار إلا أنه لغاية ١٩٩٤ لم يوافق على إضافة هذا الفيروس. أما المجموعة الرابعة فهى تشمل الفيروسات التي تسبب مرض النقطة الصفراء فى العنب وتكون أعراضها ظاهرة.

لقد أجمعت المؤتمرات الدولية أن فيروسات العنب لا تعتمدى هذه المجموعات بغض النظر عن التوزيع الجغرافى أو المسميات القديمة.

أما من حيث التصنيف فإن المجموعة الأولى والثانية، تتبع فيروسات المجموعة B وتحت مجموعة B₁ الذى يمثلها فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس PSTVd. أما فيروسات المجموعة الثالثة والرابعة فهى تتبع فى التصنيف فيروسات تحت

مجموعة B₂ الذى يمثلها فيرويد ندب الجلد فى التفاح والذى يكتب ASSVd. إن جدول ٥١ يبين هذه المجموعات وبعض صفاتها.

جدول ٥١: يبين مجموعات فيروسات العنب وبعض صفاتها.

اسم الفيروس الحالى	عدد النيوكليوتيدات	مجموعة التصنيف	الرضية على العنب	عائلة الطغى	بعض الأسماء القديمة
CEVD - g	٣٧١	تحت مجموعة B ₁	لم تذكر أعراض على العنب	الطماطم	GV٥
HSVd - g	٢٩٧	تحت مجموعة B ₁	لم تذكر أعراض على العنب	الخيار	GV3
AGVd	٣٦٩	تحت مجموعة B ₂	بلون أعراض	الطماطم والخيار	—
GYSVd - 1	٣٦٧	تحت مجموعة B ₂	نقطة صفراء	غير محدد	GVF, GV1
GYSVd - 2	٣٦٣	تحت مجموعة B ₂	نقطة صفراء	غير محدد	GV2, GV1B

١ - فيروس العنب عزلة فيرويد تقزم حشيشة الدينار

Hop Stunt Viroid - Grapevine HSVd - g

لقد أمكن عزل فيرويد من زراعات العنب فى اليابان وكان أصل هذه الزراعات مستورداً من أوروبا الغربية وأستراليا وأمريكا بالإضافة إلى الزراعات الأصلية فى اليابان، ولقد وجد هذا الفيروس فى ٢٨ نوع من العنب من بين ٣٢ نوع إختبرت أى بنسبة ٨٨٪. إن هذا الفيروس عبارة عن عزلة من فيرويد تقزم حشيشة الدينار. إن هذه العزلة من الفيروس لها مدى عائلى وتسبب أعراض فى نباتات الخيار مشابهة تماماً لتلك التى يسببها فيرويد تقزم حشيشة الدينار HSVd. إن تتابع النيوكليوتيدات فى هذه العزلة سواء المأخوذة من فرنسا أو ألمانيا أو هنجاريا أو اليابان متشابهة تماماً وهى تشكل جزئ دائرى يتكون من ٢٩٧ نيوكليوتيدة. إن هذا التتابع الموجود فى هذه العزلة يختلف عن ذاك التتابع الموجود فى الفيروس الأصيل لتقزم حشيشة الدينار HSVd بنوكليوتيدة واحدة فقط، وتقل عن عزلة HSVd - c (عزلة الخيار) بستة نيوكليوتيدات وفيها ١٥ نيوكليوتيدة مختلفة. هذا الفيروس هو HSVd - g فيه

٩٥٪ تماثل تتابع. إن هذا الفيرويد أطلق عليه فيرويد تقزم حشيشة الدينار عزلة العنب وذلك لأنه يعزل دائماً من العنب الذى تظهر عليه بعض الأعراض المرضية واعتماداً على ذلك فقد إقترح بأن العنب هو مصدر فيرويد تقزم حشيشة الدينار فى اليابان.

يؤثر هذا الفيرويد على أعناب الخمر فى جميع أنحاء العالم سواء كانت أصول أو مطعومة. إذا حقنت هذه العزلة فى نباتات الخيار فإنه يظهر على الخيار أعراض تقزم وشفافية عروق وتتجدد الأوراق، يحدث ذلك بعد ٣ - ٤ أسابيع من الحقن، أما عند حقن هذه العزلة فى حشيشة الدينار فإن ظهور الأعراض يتأخر أسبوع عن أعراض العزلة الأصلية من فيرويد تقزم حشيشة الدينار.

كما ذكرنا سابقاً فإن هذه العزلة مشابهة فى عدد النيوكليوتيدات لفيرويد تقزم حشيشة الدينار فهى تتكون من ٢٩٧ نيوكليotide وتبلغ نسبة تماثل التتابع فيها ٩٩٪ بالنسبة للعزلة الأصلية HSVd، و ٩٥٪ بالنسبة لعزلة الخيار HSVd - c، إلا أن عزلة HSVd - g تقل بستة نيوكليوتيدات عن عزلة الخيار (شكل ٧٥). تختلف عزلة العنب عن الفيرويد الأصلى HSVd فقط فى موقع الأدينين على مركز ٥٤ فى HSVd ويصبح جوانين فى عزلة العنب. كذلك فإن عزلة العنب تختلف عن عزلة الخيار فى ١٥ نيوكليotide، إلا أن موقع ٥٤ فى عزلة الخيار يشبه عزلة العنب فى كونه جوانين. Guanine. وبالتالي يمكن القول بأن التركيب الثانوى المقترح لعزلة العنب يشبه تماماً تركيب الفيرويد الأصلى HSVd.

من الصعوبة تمييز الأعراض على الخيار المتسببة عن العزلات الثلاثة (العنب - الخيار وحشيشة الدينار) إلا أن عزلة العنب أكثر قرباً وعلاقة مع الفيرويد الأصلى HSVd من عزلة الخيار.

هناك تفسيرات عديدة لوجود عزلة من الفيرويد HSVd تهاجم العنب، بعض هذه الاقتراحات تقول إن الأصل هو فيرويد يصيب العنب ومنه نشأت سلالة

ب - فيروس العنب عزلة فيروس اكسوكورتز الحمضيات

Citrus Exocortis Viroid - Grapevine CEVd - g

لقد ذكر العالم Flores سنة ١٩٨٥ أن شجيرات العنب يمكن عزل فيروسات كثيرة منها وذكر أن بعض هذه الفيروسات هو سلالة من فيروس اكسوكورتز الحمضيات. باستعمال طريقة التحليل PAGE لمستحضرات أحماض نووية حصل عليها من عدة أصناف من العنب مصابة بأمراض فيروسية مختلفة، بعد تنقية هذه الفيروسات المرافقة وجد فيها فيروس مشابه لفيروس اكسوكورتز الحمضيات. لقد أثبت العالم Flores سنة ١٩٨٥ أن هناك فيروسات تستخلص من العنب هذه سلالة من سلالات فيروس اكسوكورتز الحمضيات وسماها عزلة العنب-Citrus Ex-cocortis Viroid - Grapevine CEVd - g وتكتب باختصار .

اكتشاف الفيروس:

بتحليل الأحماض النووية المأخوذة من عديد من أصناف العنب تبين وجود جزيئات من RNA صغيرة مستقيمة ودائرية والتي ينطبق عليها وصف الفيروسات. عند حقن نباتات *Gynura aurantiaca* ببعض تحضيرات الحمض النووي المأخوذة من العنب أدى إلى ظهور أعراض نموذجية للأعراض التي يحدثها فيروس اكسوكورتز الحمضيات CEVd وبعض الفيروسات الأخرى، ولكن باستعمال الهجرة الكهربائية وجد أن هذه الأعراض متسببة عن CEVd لوحده. وبدراسة مقارنة للهجرة الكهربائية ظهر نموذجين للفيروسات النموذج الأول جزيئاته شبيهة بالفيروس أطلق عليه اسم فيروس العنب السريع (GVd - f) وهو أسرع في حركته في الهجرة الكهربائية من فيروس CEVd تحت الظروف الطبيعية أما تحت ظروف الدنترة فإنه يسلك سلوك مشابه لما يظهر في الجيل من RNAs المستقيمة بينما لا يوجد اختلاف ملحوظ في حالة الأشكال الدائرية.

أما النموذج الثاني فهو عبارة عن فيروسيد حصل عليه من نباتات *G. aurantiaca* نتيجة لحقنها بحمض نووي من مستخلصات مأخوذة من العنب وسمى فيروسيد العنب البطيء (GVd - f). وهذا الفيروسيد يهاجر مشتركاً مع CEVd في كل نظام من أنظمة الهجرة الكهربائية المستعمل في التحليل.

إن الفرق في حركة الهجرة الكهربائية بين GVd - f و GVd - s يمكن أن يوضح بافتراض أن GVd - s ذو وزن جزيئي أكبر من GVd - f، إلا أن اختلاف الحجم هذا لم يكتشف في حالة الأشكال الدائرية تحت ظروف الدنترة، قد يكون ذلك بسبب إنخفاض حركة الأشكال الدائرية من الفيروسيد تحت هذه الظروف. الاختلافات في التركيب (البنية) عدا عن الحجم يمكن أيضاً أن يزودنا بأساس لسلوك إزدواج الهجرة الكهربائية لكل من GVd - f و GVd - s.

كذلك فإن النتائج المتحصل عليها من دراسات التهجين أظهرت أن هناك تماثل تتابع متقارب جداً بين GVd - f و GVd - s وهذا متناسق مع عدم وجود اختلاف مميز في حجمهما وتشابه نوع الأعراض التي يحدثانها في *G. aurantiaca*. ومن ناحية أخرى لم يمكن اكتشاف تماثل بين GVd - f وبين الفيروسيد CEVd وهذا أيضاً كان متناسقاً مع عدم القدرة على الانتقال للشكل GVd - f إلى العوائل العشبية المشخصة للفيروسيد CEVd وهو العائل *G. aurantiaca*.

هنا يبرز السؤال الآتي هو هل GVd - f و / أو GVd - s العامل المسبب لأمراض العنب ٢٢. إن أعراض التفاف الورقة وتقلن القلف وتنقر الساق، النقطة الصفراء، التقرح، موزايك العروق ونكروزز العروق هي أمثلة للأمراض التي تصيب العنب والتي مسبباتها لم تحدد بعد وهل يفترض بأنها فيروسيدات أم فيروسات. نظراً لأن بعض هذه الأمراض ينقل بالتطعيم وأعراضها تشبه الأعراض المتسببة عن فيروسات في نباتات أخرى فقد إفترض بأنها تنسب عن فيروسات.

إلا أن الأبحاث المستمرة على العنب أثبتت أن هذه الأمراض تتسبب عن

فيرويدات وهذه الفيرويدات تتشارك مع بعضها لإحداث هذه الأعراض فقد أمكن عزل خمسة فيرويدات من نباتات العنب المصابة بهذه الأمراض. نرجع إلى السؤال الأول وهو هل GVD-f و / أو GVD-s الذى يساهم مع أخواته الفيرويدات فى إحداث المرض. نتيجة التحليل والفحص وجد أن الشكل GVD-f ليس له علاقة ببعض هذه الأعراض حيث أنه وجد فى النباتات السليمة وفى النباتات المصابة فى أصناف كثيرة من العنب وبالتالى ليس له علاقة بمرض التفاف الأوراق والنقطة الصفراء فى العنب. وبالتالى يمكن القول بأن GVD-s هو العامل المسبب لكثير من الأعراض التى تظهر على نبات العنب وهو المسبب لمرض النقطة الصفراء فى العنب.

دراسات تتابع النيوكليتيديات والصفات الحيوية للشكل GVD-s أثبتت أنه يتكون من (٣٧١) نيوكليتيده وبأن صفاته متماثلة وقرية الشبه من صفات فيرويد اكسوكورنز الحمضيات وبالتالى أطلق على هذا المسبب المرضى إسم عزلة فيرويد اكسوكورنز الحمضيات المسببة أمراض العنب.

جد- فيرويد العنب الأسترالى

Australian Grapevine Viroid

مقدمة:

إن فيرويد العنب الأسترالى (AGVd) يتكون من ٣٦٩ نيوكليتيده وهو فيرويد فيه صفات غريبة عن الفيرويدات النموذجية. هذا الفيرويد فيه أقل من ٥٠٪ تتابع مشابه لأى من الفيرويدات الأخرى المعروفة. بغض النظر عن أن تتابعه الكامل يمكن تقسيمه إلى مناطق كل منها بتتابع عال مشابهاً بذلك لقطع من فيرويد اكسوكورنز الحمضيات CEVd، فيرويد الدرنه المنزلية فى البطاطس PSTVd، فيرويد ندب الجلد فى التفاح ASSVd وفيرويدات النقطة الصفراء فى العنب. إن فيرويد AGVd يحتوى المنطقة المركزية المحفوظة كاملة لمجموعة فيرويد ASSVd

وبالتالى يعتبر فرداً من هذه المجموعة. يبدو أن فيروس AGVd قد نشأ من ظاهرة إعادة الاتحاد فى كثير من RNAs الداخلة فى الفيرويدات الأخرى. إن طريقة تكاثر العنب خضرياً والتي فيها تؤخذ العقل من شجيرات العنب السابقة وهذه من التي قبلها وهكذا فمن الممكن أن يكون قد حدث إصابات متضاعفة متسببة عن عدة فيروسات لهذه الشجيرات خلال تاريخ زراعتها الطويل وهذه الفترة الطويلة قد تكون سمحت لإعادة الاتحاد بين الفيرويدات المختلفة وأدت إلى نشوء هذا الفيرويد.

لقد عزل فيروس العنب الاسترالى AGVd أساماً من الأعناب التي تزرع فى استراليا وهو منتشر بشكل كبير هناك وأول اكتشاف كان له فى استراليا وبالتالى أطلق عليه اسم فيروس العنب الاسترالى. عند وجود هذا الفيرويد فى شجيرات العنب يؤدي إلى حدوث مجموعة من الأعراض المرضية التي ذكرناها فى الفيرويد السابق، إلا أن أهم الأعراض المميزة والتي أطلقت على هذا الفيرويد هى النقطة الصفراء فى العنب. إن عزل هذا الفيرويد من الأعناب التي فيها مرض النقطة الصفراء فى العنب لا يعنى وجوده لوحده فى العنب وإنما يشترك معه فى إحداث هذه الأعراض فيروس البقعة الصفراء فى العنب رقم ١ ورقم ٢ والتي تسمى (GYSVd - 1 , GYSVd - 2) وكذلك يشترك معه عزلات اكسوكورتز الحمضيات CEVd - g وعزلة فيروس تفزم حشيشة الدينار HSVd - g. يمكن تمييز هذا الفيرويد عن بقية الأربعة فيروسات الأخرى بواسطة الهجرة الكهربائية فى الجيل وكذلك بواسطة مقدرته على التناسخ فى الخيار والطماطم وعدم مقدرته على التهجين مع منقبات فيروسات أخرى. إن التركيب الكامل للفيروس AGVd يظهر أنه جزئى مركب طبيعياً والذي يمكن أن يكون قد نشأ من إعادة الاتحاد من فيروسات أخرى وهذه الظاهرة معروفة بين الأحماض النووية وتسمى Recombination.

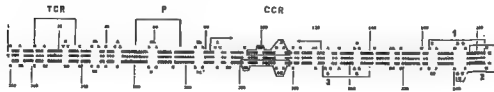
تتابع النيوكليوتيدات الكامل للفيروس AGVd :

إن تتابع النيوكليوتيدات فى الفيروس وتركيبه الثانوى المقترح يظهر فى شكل ٧٦. إن فيروس AGVd هو جزئى دائرى من RNA يتكون من ٣٦٩ نيوكليوتيدة

وهذه النيوكليوتيدات موزعة كالآتي: ١٠٣ C بنسبة ٢٧,٩٪، ١١١ G بنسبة ٣٠,١٪، ٧٦ A بنسبة ٢٠,٦٪ و ٧٩ U بنسبة ٢١,٤٪. وإن نسبة C + G تساوى ٥٨٪ وهى تتشابه فى كثير من الفيرويدات. وكما هو معروف بالنسبة لكل الفيرويدات فإنه لا يشفر لأى بروتين.

إن التركيب الأولى للفيرويد AGVd يترتب بحيث يسمح بتكوين أعلى درجة من تزاوج القواعد كما فى شكل ٧٢. الشكل الناتج يكون شبه عصوى نموذجى للفيرويدات. من مجموع القواعد فإن ٦٩٪ من هذه القواعد هى أزواج والمراكز المتزاوجة تتكون من ٥٤,٧٪ GC و ٢٩,٧٪ AU و ١٥,٦٪ GU. عند مقارنة فيرويد AGVd مع فيرويدات أخرى مثل ASSVd الذى هو من مجموعته تبين أن AGVd يحتوى أكبر عدد من قواعد الأزواج غير المتقاطعة الممتدة وبالتالي يبدو بأنه أكثر التراكيب الثانوية ثباتاً.

كما فى جدول ٥٢ هناك إختلاف مفرد واحد فى التتابع وجد فى كلون cDNA والذى فيه الموقع رقم ٥٥ قد حذفت منه النيوكليوتيدة. من الممكن أن مرور AGVd خلال نبات الخيار لتتقيته كان له تأثير تصفية فى إستبعاد تنوعات التتابع فى هذا الفيرويد، فى حين أن فيرويدات العنب الأخرى 1 - GYSVd وكذلك 2 - GYSVd فيها العديد من تنوعات التتابع.



شكل رقم ٧٦ :

التركيب الثانوى المقترح لفيرويد AGVd. المراكز المحدودة بصناديق هى المنطقة المركزية المحفوظة فى الخيط العلوى والسفلى من فيرويد ASSVd. تشير الأسهم إلى التتابع الذى يمكن أن يكون تركيب متماكس. الأرقام ١، ٢، ٣ تشير إلى البرامير المستعمل.

جدول ٥٢: تعاقب ازواج القواعد في فيرويدات مجموعة الفيرويد ASSVd.

التكرار في الفيرويدات				طول منطقة ازدواج القواعد
AGVd	GYSVd - 2	GYSVd - 1	ASSVd	
٦	٦	٤	٤	٤
٥	٥	٥	٤	٥
٣	٣	١	١	٦
١	—	—	١	٧
٢	—	—	—	٨
—	—	—	١	٩
١	—	—	—	١١
١٠١	٦٧	٤٧	٥٨	مجموع ازواج القواعد في المناطق المذكورة أعلاه
٣٦٩	٣٦٣	٣٦٧	٣٣٠	عدد النيوكليوتيدات الكلي

تركيب النطاقات في الفيرويد AGVd:

إن المنطقة المركزية في الفيرويد AGVd (كما في شكل ٧٦) تشمل جميع التتابعات المحفوظة في مجموعة فيرويدات ASSVd. هذه المنطقة المحفوظة تتكون من ١٦ مركز في الجزء السفلي و ١٨ مركز في الجزء العلوي من التركيب الثانوي للفيرويد وهي إبتداءً من رقم ٩٥ إلى رقم ١١٠ في الخيط العلوي وإبتداءً من رقم ٢٦٢ إلى ٢٧٩ في الخيط السفلي. هناك مركزين غير متوافقين محددين في المنطقة المحفوظة السفلية في الفيرويد ASSVd (موقع ٢٢٩ و ٢٢٨) وكذلك في فيرودين آخرين من هذه المجموعة، وهذا راجعاً إلى بعض الأخطاء في طباعة

الكمبيوتر الذى استعمل فى دراسة تتابع ASSVd. وبالتالي فإن المنطقة المركزية المحفوظة كلها CCR فى الفيروس ASSVd هى نفسها فى كل من 1 - GYSVd و 2 - GYSVd وفى AGVd.

إن التابع المحفوظ العلوى فى الفيروس AGVd والثلاثة عشر مركزاً المحيطية الجانبية على أربعة جوانب (٤٢ مركز) عندها القدرة لأن تعمل تزاوج قواعد مع نفس التابع من ٤٢ مركز موجوداً فى جزئ آخر من AGVd أو فى أى منطقة من جزئ Multimeric من AGVd ليشكل تركيب متعاكس Palindromic وقد اقترح أن هذا الارتباط يشكل مواقع إنشطار لوحدة طول فى الفيروسات. إن التابع ال ٤٢ مركز فى AGVd والمراكز المماثلة لها فى الخيط السفلى يمكن أن تنفرد وتكون شكل صليب فى الفيروس.

نطاقات المرضية والأطراف:

Pathogenicity and Terminal Domains

يبدأ نطاق المرضية فى هذا الفيروس من المركز ٥٣ ويمتد إلى مركز ٧٠ فى الخيط العلوى. هذا التابع يشابه نطاق المرضية فى الفيروسات الأخرى. إن التابع AAAGAAAA موجود فى نطاقات المرضية فى معظم فيروسات تحت مجموعة B₁ وهو موجود فى الفيروس AGVd من مركز ٥٣ إلى مركز ٦١. عند مقارنة نطاق المرضية فى فيروس AGVd مع الفيروسات الأخرى نجد أنه أكثر انتظاماً فى قواعد الأزواج وفيه عروة واحدة فقط. إن ثبات تتابع أزواج القواعد فى نطاق P فى الفيروس AGVd يتوافق مع قلة حدوث التعبير المرضية فى النباتات العشبية وهذه الظاهرة ملاحظة أيضاً فى فيروس PSTVd حيث أن زيادة ثبات أزواج القواعد فى تتابع نطاق P يرتبط مع نقص الشدة المرضية للفيروس.

أما المنطقة الطرفية اليسرى للفيروس AGVd فهى تشمل تتابع ١٧ نيوكليتيده من مركز ١١ إلى ٢٧ والتى تكون محفوظة فى مواقع نموذجية أو مشابهة لمعلم

الفيرويدات الأخرى. علاوة على ذلك فإن جميع الفيرويدات ذات الحجم الجزيئى الذى يقارب من ٣٦٠ نيوكليتيده تحتوى هذا التابع، بينما تلك التى هى أقل من ٣٠٠ نيوكليتيده تفتقر إلى هذا التابع. إن دور هذه المنطقة الطرفية المحفوظة TCR فى تناسخ الفيرويد والمرضية غير معروف (١٩٩٢).

مقارنة الفيرويد AGVd مع الفيرويدات الأخرى:

إن الفيرويد AGVd يظهر أقل من ٧٥٠ من تماثل التابع الكلى الذى يتشابه مع أى من الفيرويدات المعروفة الأخرى. إن أعلى تتابع متشابه لوحظ هو ٤٩٪ يحدث بين AGVd وأى من فيرويدات مجموعة ASSVd أو CEVd. إن التماثل بين AGVd و 1 - GYSVd يشمل ٣٤ مركز متطابق فى المنطقة العلوية والسفلية من CCR والتى توجد فى كل أفراد مجموعة ASSVd. وبالتالي فإنه فى خارج CCR فإن الفيرويد AGVd فيه تماثل تتابع أعلى مع فيرويد CEVd منه مع 1 - GYSVd.

مع أن تماثل التابع الكلى بين AGVd و CEVd هو فقط ٤٩٪، إلا أن هناك مناطق معينة فى هذين الفيرودين فيهما تماثل تتابع تام واصطفاف هذه المناطق يكون على نفس الخط بالنظر للتركييبات الأولية لجزيئات هذين الفيرودين. إن الإستثناء الوحيد هو تتابع من ٢١ مركز والتى تشكل نصف المنطقة العلوية CCR فى الفيرويدات من مجموعة PSTVd. هذا التابع المحفوظ يحدث على جانب اليد اليمنى من CCR السفلى فى الفيرويد AGVd.

إن الجزء العلوى من AGVd يحتوى مناطق بالإضافة إلى CCR والتى تكون غالباً أكثر قرباً وعلاقة مع التتابعات فى ASSVd. وأخيراً فإن هناك مجموعة من تسعة مراكز بين نطاق P و TCR فى الفيرويد AGVd وهى من ٣٥ - ٤٣ والتى توجد فى المناطق الماثلة من الفيرويد 1 - GYSVd.

بالنظر إلى جميع هذه التتابعات المتماثلة، تقريباً فإن جميع تتابعات الفيرويد AGVd يمكن أن تفسر عن طريق وجود علاقة تتابع فى CEVd، ASSVd، 1 - GYSVd

_____ فيروسات تحت مجموعة B₂ و B₃ _____

وفى ال CCR فى مجموعة الفيروس PSTVd وهذا يدل على أن AGVd مركب من تباينات مكونة من ١٢ مجموعة محددة.

د - فيروسات النقطة الصفراء فى العنب

Grapevine Yellow Speckle Viroids

مقدمة:

كان أول ذكر لمرض النقطة الصفراء فى العنب سنة ١٩٧٢ فى استراليا وذلك من قبل العالم Tayler. إن النقطة الصفراء مرض يصيب العنب وهو واسع الانتشار فى المناطق المروية فى استراليا حيث يزرع معظم أنواع عنب الزيتون والخمور. تكون أعراض المرض عبارة عن نقط صغيرة وبثرات صفراء منتشرة فوق سطح الورقة، وهذه الأعراض تكون سائدة فى شهور الصيف الحارة فى النباتات المصابة. مع أن المرض شبيهة فى أعراضه مع الأمراض الفيروسية فى الطبيعة، إلا أنه لم يمكن عزل أجزاء فيروسية من الأنسجة المريضة وبذلك إقترح بأن هذا العامل المسبب للمرض هو فيروس ذلك قبل العالم Bovey ورفقاه سنة ١٩٨٠ وكذلك Flores et al سنة ١٩٨٥.

إن مرض النقطة الصفراء فى العنب Grapevine Yellow Speckle Disease قد تبين بأنه يتسبب بشكل مستقل عن فيروسين مختلفين يعرفان باسم:

(GYSVd - 1) Grapevine Yellow Speckle Viroid - 1

(GYSVd - 2) Grapevine Yellow Speckle Viroid - 2

إن كلا الفيروسين عضوين فى تحت مجموعة فيروسات B₂ التى يمثلها فيروس ندب الجلد فى التفاح ASSVd وفيها ٢٧٣ تماثل تتابع. إن كلا الفيروسين الأول والثانى قد اكتشفا فى الأعناب المظهرة للأعراض المرضية وغير المظهرة للأعراض فى أعناب استراليا بالإضافة لوجودهما بوضوح فى الأنسجة غير المظهرة للأعراض فى أعناب كاليفورنيا.

أولاً؛ فيروس النقطة الصفراء فى العنب رقم ١

Grapevine Yellow Speckle Viroid - 1 (GYSVd - 1)

لقد عزل RNA وحيد الخيط دائرى من نباتات العنب المصابة بمرض النقطة الصفراء وسمى هذا الحمض باسم فيروس النقطة الصفراء فى العنب رقم ١ وهو يحتوى ٣٦٧ نيوكليتيده وعنده المقدرة على أن يكون تركيب ثانوى شبه عصوى الذى تتصف به الفيروسات. إن هذا الفيروس فيه ٣٧٪ تماثل تتابع مع فيروس ندب الجلد فى التفاح ASSVd وعنده بعض تماثل التتابع مع فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس PSTVd. إن تتابع فيروس GYSVd وصف بأنه مناسب مع تراكيب النقاطات الموصوفة فى PSTVd، إلا أن هذا الفيروس يفتقر إلى تتابع المنطقة المحفوظة فى PSTVd. بدلاً من ذلك هناك تتابع محفوظ فى المنطقة المركزية فى الفيروس 1 - GYSVd والتي عندها الكفاءة لتشكيل عروة ساق وتركيب متعكس Palindromic ثابت مثل الذى تفعله المنطقة المركزية المحفوظة فى مجموعة PSTVd. هذه الصفات التركيبية تؤدي إلى الاقتراح بأن هناك منطقة محفوظة مركزية مختلفة لكل من 1 - GYSVd و ASSVd.

صفات الفيروس 1 - GYSVd :

لقد ثبت بأن الحمض النووى المعزول من أصناف العنب المصابة بمرض النقطة الصفراء يتكون من خيط مفرد دائرى RNA. إن هذا الخيط يهاجر كخيط مفرد RNA تحت ظروف الدنترة. كما فى RNAs الدائرية الأخرى المعزولة من العنب فإن إنتاج 1 - GYSVd منخفض تقريباً فهو يعطى حوالي ١ ميكوغرام فيروس من كل كيلوغرام سيق ورقة.

يتكون الفيروس من ٣٦٧ نيوكليتيده وهى كالاتى A:U ٢٦٪، G:C ٥٣٪ و G:U ٢١٪ وإن نسبة G+C تساوى ٧٦٪.

مطابقة الفيرويد 1-GYSVd مع نموذج نطاقات الفيرويدات:

إن فيرويد 1 - GYSVd يمتلك 237 تماثل تتابع بالنسبة للفيرويد ASSVd. تكون المراكز المتماثلة في كلا الفيرودين غير عشوائية التوزيع ولكنها تحدث في مجموعات من أزواج القواعد في التركيب الثانوي في كلا الفيرودين. كذلك فإن هناك أيضاً بعض التماثل بين 1 - GYSVd و ASSVd مع أفراد من مجموعة PSTVd والذي تحدد في ثلاثة مجموعات من القواعد.

إن مقارنة التتابع بين 1 - GYSVd و ASSVd من ناحية ومجموعة PSTVd من ناحية أخرى يبين أن 1 - GYSVd يتطابق مع نموذج نطاقات الفيرويد المفترض من قبل Keese and Symone سنة 1985 وهو يتكون من T₁، T₂ وهما نطاقي الطرف الأيمن والطرف الأيسر ويعتبران متغيران بين الفيرويدات المختلفة ثم نطاق P وهذا النطاق يتعلق بحرضية الفيرويد ثم نطاق C وهو المنطقة المركزية المحفوظة وهي ضرورية لتجهيز وتناسخ الفيرويد. نطاق V وهي منطقة عالية الاختلاف في التتابع.

هناك مسافة ممتدة تتكون من 17 مركز موجودة في منطقة T₁ من التركيب الثانوي للفيرويد 1 GYSVd. لا يوجد تتابع في المنطقة المفترضة للنطاق T₂ تشارك مع فيرويدات من مجموعة PSTVd، ولكن هذه المنطقة محددة بواسطة امتدادات لتتابع مشترك للفيرويديين 1 - GYSVd و ASSVd. أما نطاق P فإن هناك 19 مركزاً من تتابع Oligopurine في هذا الفيرويد تقع بين مركز 61 و 90 وهي ذات جزء غني بالآدينين يقع بين 63 و 73. في التركيب الثانوي المفترض من الفيرويد 1 - GYSVd فإن التتابع الغني بازواج القواعد من الآدينين يتركب مع تتابع U في الخيط المقابل في مراكز 299 - 309. أما نطاق C، فإن فيرويد 1 - GYSVd مثل فيرويد ASSVd لا يحوى تتابع منطقة C الشائع في جميع الفيرويدات الأخرى من مجموعة PSTVd. وعلى أية حال فإن هناك 16 مركز محفوظة في منطقة شبيهة لموقع المنطقة المركزية المحفوظة في PSTVd. هذه التتابعات تتدخل بكفاءة في تكوين تركيبين والتي تشابه تلك التي في منطقة C في مجموعة PSTVd.

إن الجزء العلوى من منطقة C فى فيروس 1 - GYSVd تستطيع بكفاءة أن تتخذ تكوين ساق عروة بسة عشر قاعدة محفوظة كلية مغطية قمة التركيب. المراكز المحيطة الجانبية بالتتابع المحفوظ كلية تشارك فى الساق فى الفيروس. لقد افترض أن تركيب ساق العروة يتدخل فى الانتقال بين التركيب الطبيعى للفيروس والتركيبات الهامة فى تناسخ الفيروس.

فى الفيروس 1 - GYSVd هناك ٣٦ مركزاً تتدخل فى تكوين تركيب ساق العروة. هذه الستة وثلاثون مركزاً عندها المقدرة على تكوين تركيب متعكس ثنائى مع جزئ آخر من 1 - GYSVd فى شكل مستقيم. إن هذا التركيب الثنائى المزدوج يمكن أن يتكون ضمن جزئيات 1 - GYSVd ألى Multimeric. إن الستة عشر مركزاً المحفوظة تماماً تشكل القلب المركزى فى هذا الجزء الثنائى. بناءً على ذلك يمكن القول بأن الفيروس 1 - GYSVd والفيروس ASSVd لهما منطقة محفوظة مركزية فريدة عن بقية الفيروسات.

أما نطاق V فإنه يمتد بين مركز ١٢٢ و ١٤٥ وهو إمتداد قصير من حلزون مكون من أوليجوبيورين وأوليغوبيرمين.

ثانياً: فيروس النقطه الصفراء فى العنب رقم ٢

Grapevine Yellow Speckle Viroid - 2 (GYSVd - 2)

كان هذا الفيروس سابقاً يسمى GVd 1B وهو مثل فيروس النقطه الصفراء فى العنب رقم ١ 1 - GYSVd يمكن أن ينتقل إلى شجيرات العنب الخالية من الفيروسات عن طريق الحقن الميكانيكى وكل من الفيروسين يحدث أعراض مرض النقطه الصفراء فى العنب. عند تنقية الفيروس 2 - GYSVd من أصناف العنب كما فى طريقة Rezaian et al سنة ١٩٨٨ وإجراء طرق التحليل المختلف تبين أن الفيروس له تركيب ثانوى شبه عصوى (شكل ٧٧).

إن فيروسد 2-GYSVd يتكون من ٣٦٣ نيوكليتيده تتكون من ٦٨ A، ٧٧ U، ١٠٦ G و ١١٢ C. وبالإجمال ٢٦٧ من نيوكليتيده أزواج قواعد وأزواج القواعد هذه ٢٣٣ A : U، ٥٥ C : G و ١١٢ U : G. هناك إختلاف في التتابع لوحظ بين كلونات cDNA للفيروسد 2-GYSVd. التغيرات كانت G → A على مواقع ٣٠٠ و ٣٢٨، C → U على المواقع ٣٤٤ و C → U على موقع ٣٦٠ وهناك حذف على موقع ٨.

إن تتابع الفيروسد 2-GYSVd قورن مع تتابعات الفيروسات المعروفة الأخرى باستعمال برنامج الكمبيوتر الذى وضعه Wilbur & Lipman سنة ١٩٨٣. إن درجة التشابه بين مختلف تركيب النطاقات فى الفيروسد 2-GYSVd والفيروسات المعروفة الأخرى فى جدول ٥٣. إن هذا الفيروسد يحتوى تتابع فى منطقته المركزية مشابه تماماً لذلك الموجود فى 1-GYSVd و ASSVd. إن التتابعات المركزية فى 2-GYSVd مختلفة تماماً عن تلك الموجود فى تحت مجموعة B₂ من الفيروسات والتي تعطى زيادة فى التأكيد عن وجود إختلاف بينهما.

إن الفيروسد 2-GYSVd قريب الشبه جداً مع الفيروسد 1-GYSVd، حيث فيه ٧٣٪ تشابه كلى معه والذى يمكن أن يتسبب عنه Cross-hybridization والذى لوحظ بين الفيرودين. إن تركيب فيروسد 2-GYSVd يتوافق مع نموذج النطاقات المقترح من قبل Keese & Symons سنة ١٩٨٥ وفيه يمكن تحديد نطاق P، C و T₁ بسهولة. إن وجود نطاق V مشكوك فى موقعه بالضبط فى هذا الفيروسد حيث أن حلزون Oligopurine : Oligopyrimidine يحتوى على الأقل ٣ أزواج قواعد GC كما حدد فى نموذج النطاقات وهنا غير واضح فى الموقع العادى بين منطقتى C و T₂. أما نطاق P فى هذا الفيروسد فهو غنى باليورين فى الخيط العلوى وغنى باليوردين فى الخيط السفلى والذى يؤدى إلى تماثل تتابع عال نسبياً عندما يقارن نطاق P فى 2-GYSVd مع نطاق P فى الفيروسات الأخرى.

إن الخيط العلوى من التتابع المركزى المحفوظ الموجود فى 1 - GYSVd و 2 - GYSVd و ASSVd هو تتابع متكرر معكوس. إن التتابع المتكرر المنقلب فى العشرة قواعد يحيط جانبياً بالخيط العلوى من التتابع المركزى المحفوظ فى GYSVd 2 -، وإن هذه العشرة قواعد ذات التتابع المكرر المعكوس مشابهة تماماً لتتابع العشرة قواعد والتي تحيط جانبياً بالتتابع المركزى المحفوظ فى 1 - GYSVd. وعلى أية حال فإن مركز A الموجود فى موقع ٨٧ من تتابع الفيرويد 2 - GYSVd ومركز U الموجود على موقع ١١٦ من تتابع الفيرويد نفسه قد تغيرت فى 1 - GYSVd الفيرويد إلى G و C بالترتيب.

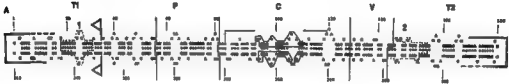
أما نطاق T_2 فى الفيرويد 2 - GYSVd فإنه بشكل عام يظهر قليل من تماثل التتابع مع نطاقات T_2 فى الفيرويدات الأخرى. وعلى أية حال هناك بعض التتابع المحفوظ بين نطاقات T_2 فى 2 - GYSVd و 1 - GYSVd و ASSVd. إن المراكز من ١٧٠ إلى ١٨٥ فى الجزء الطرفى من منطقة T_2 من الفيرويد 2 - GYSVd مكررة فى الجزء الطرفى من منطقة T_1 (مراكز ٣٥١ - ٦). إن التكرار فى منطقة T_1 غير كامل بسبب الثلاثة مراكز الزائدة عن ما هو موجود فى T_2 الموجودة فى مواقع ٣٥٦، ٣٥٧ و ٥. إن النهاية 3 فى كل تتابع مكرر محاطة جانبياً بواسطة منطقة غنياً باليوردين. إن التكرار المباشر على نهايات مناطق T ليس واضحاً فى الفيرويدات الأخرى.

هناك مجموعة من التتابع فى منطقة T_1 من الفيرويد 2 - GYSVd والتي هى محفوظة وموجودة فى موقع مماثل فى كل من 1 - GYSVd و ASSVd، وعلى أية حال فإن مواقع ٣٣٩ فى 2 - GYSVd هو مركز فى ASSVd. وإن المراكز من ١٨ إلى ٣٠ هى أيضاً محفوظة فى عدد من فيروسات مجموعة PSTVd.

إن الفيرويد 2 - GYSVd فيه ٤٩ تماثل تتابع مع فيروسات النبات الذكري فى الطماطم TPMVd. إن تماثل التتابع العال بين TPMVd و 2 - GYSVd فى

الأصل بسبب مجموعة من ٦٩ مركز في نهاية اليد اليسرى من الفيروس 2 - GYSVd والتي هي مماثلة إلى حد كبير مع المنطقة المشابهة لها في نهاية اليد اليسرى من الفيروس TPMVd. وبشكل عام فإن نطاق T₁ في الفيروس 2 - GYSVd فيه تماثل تتابع عال مع نطاقات T₁ في الفيروسات CEVd، TPMVd، PSTVd. وهذا يزودنا بأدلة أكثر لأهمية إعادة الاتحاد في RNA ودوره في تطور الفيروس.

إن العالم Keese & Symons قد ذكر سابقاً ملاحظات عن إعادة الاتحاد في الحمض النووي RNA بين أفراد فيروسات تحت مجموعة B₁ التي يمثلها فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس وهذه الملاحظات تنطبق على الفيروس 2 - GYSVd.



شكل رقم ٧٧ :

تتابع النيوكليوتيدات والتركيب الثانوي المقترح لفيروس 2 - GYSVd. يوضح كذلك أماكن النطاقات. الأهم تشير (مرسومة فوق) للمراكز المتكررة المقلوبة والتي تحيط جانبياً بالمنطقة المركزية المحفوظة (محصورة في خطوط سوداء غامقة). الصناديق المكونة من نقط رقم ١ و ٢ تحتوي المراكز والتي هي أيضاً محفوظة في فيروس ASSVd و 1 - GYSVd. التتابع المتكرر المباشر موجود في الأجزاء الطرفية من T₁ و T₂ في الفيروس 2 - GYSVd ومشار إليها بخطوط سمكية، أما المناطق الغنية بـ U والتي تلف جانبياً على 3' في كل تكرار يشار إليها بشرطت سمكية، الأعلام تدل على حدود تتابع GYSVd والذي يكون دائماً نموذجي كما هو موجود في فيروس TPMVd.

جدول ٥٣ : يبين مائل التتابع بين نطاقات الفيرويدات المختلفة.

Z مائل تتابع						الفيرويدات المستعملة في المقارنة المزدوجة	
النطاقات						٢	١
التي	T ₂	V	C	P	T ₁		
٧٣	٤١	٥٣	٨٦	٦١	٨٦	GYSVd - 1 - GYSVd - 2	
٤٦	٣٨	—	٥٩	٥٢	٤٠	ASSVd - GYSVd - 2	
٤٢	٤٥	—	٥٣	٤٦	٣٣	GYSVd - 1 - ASSVd	
٣٨	×	×	٣٠	×	×	GYSVd - 2 - HLVD	
٣٠	×	×	٢٢	×	×	ASSVd - HLVD	
٤٢	×	×	٢٨	×	×	GYSVd - 1 - HLVD	
٤٢	٢٧	—	٣١	٥٧	٤٨	GYSVd - 2 - PSTVd	
٤٢	١١	٢٤	٢٦	٤٦	٥٢	ASSVd - PSTVd	
٣٧	٢٦	—	٢٦	٤٦	٥٠	GYSVd - 1 - PSTVd	
٤٤	×	×	٥٣	×	×	HLVD - PSTVd	
٤٩	٣٦	—	٢٥	٥٩	٦٦	GYSVd - 2 - TPMVd	
٣٦	٢٨	—	٣٢	٤٦	٤٦	ASSVd - TPMVd	
٤٤	٣٦	—	٢٣	٤٢	٥٦	GYSVd - 1 - TPMVd	
٤٥	×	×	٥٤	×	×	HLVD - TPMVd	
٣٧	٢٤	—	٢٥	٣٨	٣٠	GYSVd - 2 - CSVd	
٤٤	٢١	—	٣٤	٤٤	٤٦	ASSVd - CSVd	
٤٠	٣٣	—	٢٢	٥٥	٣٠	GYSVd - 1 - CSVd	
٣٧	×	×	٦١	×	×	HLVD - CSVd	
٤٠	٣٣	—	٢٥	٥٠	٥٩	GYSVd - 2 - CEVd	
٤٠	٢٧	٢٨	٢٩	٤٠	٤٣	ASSVd - CEVd	
٤٠	٢٥	—	٢٥	٥٥	٥٢	GYSVd - 1 - CEVd	
٤٠	×	×	٦٩	×	×	HLVD - CEVd	
٤٢	٣٨	—	٢٦	٥٠	٤٦	GYSVd - 2 - TASVd	
٤٠	٣٤	—	٣٠	٥٢	٤٣	ASSVd - TASVd	
٤٠	٣٦	—	٢٦	٥٥	٤٩	GYSVd - 1 - TASVd	
٤٧	×	×	٦٨	×	×	HLVD - TASVd	
٣٤	٧	—	٢١	—	—	GYSVd - 2 - CCCVd	
٣١	٣٣	—	٢٨	٣١	—	ASSVd - CCCVd	
٣٠	٢٨	—	٢٧	٢١	١٩	GYSVd - 1 - CCCVd	
٥٠	×	×	٦٠	×	×	HLVD - CCCVd	
٣٤	١٦	—	٢٤	٤٠	٢٠	GYSVd 2 - HSVd	
٣٦	٢٦	—	٢٣	٤٠	٢٤	ASSVd - HSVd	
٣٨	٢٥	—	٢٣	٥٠	٢٨	GYSVd 1 - HSVd	
٤٢	×	×	٤٥	×	×	HLVD - HSVd	

(-) = لم يحدث قياس. (X) المنطقة المركزية المحفوظة هي المنطقة الوحيدة التي حددت في HLVD واستعملت في المقارنة.

مقارنة بين 1-GYSVd و 2-GYSVd :

بدراسة تتابع الفيرودين المذكورين أعلاه كل على حدة تبين أن كل منهما يحتوى على تتابع مركزى متماثل وكلاهما موجود على شكل تركيب شبه عصوى وكلاهما ينتمى إلى تحت مجموعة B₂ التى يمثلها ASSVd. أما بالنسبة لحيوية كل من الفيرودين، فقد وجد أن كلا الفيرودين ينتقل إلى الطماطم أو الخيار. إن جدول رقم ٥٤ يبين حيوية كل من الفيرودين على بادرات العنب من حيث التناسخ وأحداث أعراض ظاهرية والانتقال.

إن استعمال نسخاً مبنية من RNA فى المعمل أظهر نسبة منخفضة فى إحداث الأعراض على النباتات، هذا يدل إما على تلوث اللقاح أثناء التحضير، أو الحغن بطريقة غير محكمة أو غير متحكم بها. كما وأنه ليست جميع النباتات المحقونة بالفيرودين أصيبت مصابة، وهذا قد يكون بسبب الاختلافات الوراثية للنباتات المختبرة حيث أنها مفتوحة التلقيح أى أن بادراتها مختلفة وراثياً أو إلى كفاءة طريقة الحغن الميكانيكى، كما أنه يمكن تفسير هذه النتائج بوجود تنوعات تتابع فى الفيرويدات.

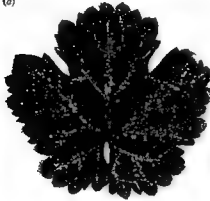
تعبيرات الأعراض :

كما هو ملاحظ فى جدول رقم ٥٤ فإن واحداً من أربعة نباتات حقنت بنسخ 1-GYSVd موجب ذو معنى Dimeric تحتوى 1-GYSVd - monomeric. إن كلا من 1-GYSVd و 2-GYSVd يسبب أعراض مرضية على شكل نقط خضراء مصفرة دالة على مرض النقطة الصفراء الشديد والتى تلاحظ على طول العروق فى الورقة فى بعض الأوراق من النبات، وهذا يزودنا بدليل مباشر على أن كلا من الفيرودين يسبب مرض النقطة الصفراء فى العنب بمفرده أو مشتركاً مع الآخر ولكن بملاحظ شكل ٧٨ نجد أن الأعراض المتكونة على النباتات المحقونة بالفيرويد 2-GYSVd تكون أقل شدة من تلك المتسببة عن 1-GYSVd وتكون مبعثرة كثيراً على سطح الورقة.

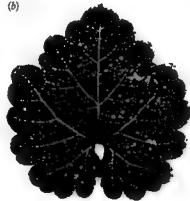
جدول ٥١: حيوية الفيروسات GYSVd-1 و GYSVd-2 المحقونة في نباتات عنب خالية من أي مسبب مرضي.

نوع اللقاح	كمية اللقاح في كل نبات	عدد النباتات المحقونة	عدد النباتات المتكاثف عليها		أعراض مرض النقطة الصفراء
			GYSVd-1	GYSVd-2	
١- GYSVd-1 نقي	٦ نانوغرام	١٦	٨	—	١
٢- مخلوط أحماض نووية فيها الفيروس GYSVd-1	٣٤ نانوغرام	٥	٤	—	٢
٣- GYSVd-2 نقي	٦ نانوغرام	٩	—	٧	٤
٤- GYSVd-1 + GYSVd-2	٦ نانوغرام	٥	٣	٤	١
٥- نسخة موهجة GYSVd-1	٢٠٠ نانوغرام	٤	١	—	١
٦- نسخة سالبة GYSVd-2	٢٠٠ نانوغرام	٣	—	—	—
٧- كترول	—	٩	—	—	—

(a)



(b)



شكل رقم ٧٨ :

أعراض مرض النقطة الصفراء على أوراق من العنب محقونة. a = أعراض شديدة متكونة من GYSVd-1 الفيرويد أما b = أعراض خفيفة متكونة عن الفيرويد GYSVd-2.

أما النباتات المحقونة بنسخ 1 - GYSVd - Dimeric سالب ذو معنى لم يتكشف فيها الفيرويد 1 - GYSVd ولم يظهر عليها أعراض. عند ترك جميع النباتات المحقونة وغير المحقونة تحت ظروف الصيف الطبيعية لوحظت تعبيرات الأعراض المرضية لمرض النقطة الصفراء في العنب واضحة جداً. وبشكل عالم يمكن القول بأن مرض النقطة الصفراء في العنب تزداد شدة أعراضه بزيادة نشاط أى من الفيرودين وإن أعراض المرض على النباتات المحقونة تتراوح من شئ بسيط من البقع الصفراء الكرومية إلى حزم خضراء مصفرة على طول العروق. هذه الأعراض مشابهة للأعراض التي تحدث في الحقل طبيعياً والتي تكون مختلفة الشكل واللون ضمن النبات الواحد من نفس النوع المزروع من العنب وبين المواسم المختلفة.

كذلك لقد وجد أن 1 - GYSVd ينتشر في جميع زراعات العنب في أستراليا وحتى في النباتات التي لا تظهر أعراض مرض النقطة الصفراء في العنب. أما فيرويد 2 - GYSVd فإنه يوجد حيث يوجد 1 - GYSVd. وهناك استثناء حالة واحدة وهى النباتات التي أعيد تكاثرها من زراعة أجزاء من قمة الفرع في مزرعة نسج حرارتها ٣٥ م. هذه النباتات تظهر عليها أعراض مرض النقطة الصفراء وتحتوى 1 - GYSVd لوحده ولا تحتوى 2 - GYSVd. وعلى أية حال فإن تكاثر فيرويد 2 - GYSVd يكون مع ذلك منفصلاً عن تكاثر الفيرويد 1 - GYSVd حيث أنهما يمكن أن يتكاثرا مستقلين في نباتات العنب.

يمكن الحصول على نباتات عنب خالية من الفيرويدات عن طريق إنتاج شتلات من مزارع القمة النامية حيث يؤخذ طول ٠,١ - ٠,٢ مليمتر من قمة فرع النبات تحتوى كتلة القمة النامية مع مبادئ ورقتين قيميتين وتزرع في المعمل حسب نظام مزارع النسج. يتكشف على هذه الأجزاء جذر وساق ثم يتبع معها جميع الإجراءات اللازمة للنمو حتى تصبح بادرة هذه البادرة تكون خالية من الفيرويد.

ثانياً : فيروسات تحت مجموعة B3

فيروسات الكوليس

Coleus Viroids

مقدمة :

نبات الكوليس Coleus من نباتات الزينة يتبع العائلة الشفوية (Lamiaceae) أو Labiatae، نبات زينة له أوراق حمراء اللون مبرقشة. تنتشر زراعة هذا النبات في كل من البرازيل، كندا، اليابان، ألمانيا والولايات المتحدة الأمريكية ويأخذ ترتيب رقم عشرة في شهرته النباتية في الحدائق في أمريكا الشمالية. إن الصنف Amarelo هو أكثر الأصناف المزروعة عرضة للإصابة بالأمراض الفيروية تحت ظروف الحقل العادية وهو لا يظهر أعراض مرضية مرئية وذلك لأن لون الأوراق أصفر. أما الأصناف الأخرى مثل Frilled Fantasy فتظهر عليه أعراض الإصابة الفيروية على شكل شحوب الأوراق، كما يؤثر الفيرويد على نسبة الإنبات في البذور ويزيدها وقد تزيد نسبة الإنبات في البذور المصابة ٣٥٪، كما أن البذور المصابة بالفيرويد تنبت قبل البذور السليمة بحوالى ثلاثة أيام. ليس للفيرويد تأثير على حجم الورقة ولا على عدد الأوراق ولا على طول النباتات المصابة. أما في الأصناف الأخرى تكون الأعراض على شكل صبغات أرجوانية على الأوراق. هناك أصناف

أخرى تكون حاملة للفيرويد بدون ظهور أعراض مرئية. يمكن اكتشاف الفيرويد في النبات بعد ٢ - ٣ أسابيع من الحقن.

أولى الأمراض الفيرويدية على الكوليس لوحظت في البرازيل سنة ١٩٨٥ وذلك من قبل العالم Fonseca et al وذكر أول فيرويد يصيب الكوليس وكذلك وصفه العالم Lebowitz سنة ١٩٨٥ أثناء عمله على تربية نباتات الكوليس. أول فيرويد ذكر على الكوليس سمي فيرويد الكوليس الأصفر Yellow Coleus Viroid وسمى بهذا الاسم لأن الفيرويد كان أول مصدر له هو الصنف Amarelo وهو يعنى باللغة البرتغالية الأصفر، وبالتالي يصاب الصنف بالفيرويد ولا تظهر عليه أعراض الإصابة التي هي الشحوب الأصفر فكان الفيرويد متخصص مع هذا الصنف الأصفر ولكن بعد ذلك تبين أن جميع النباتات في الجنس كوليس تصاب بهذا الفيرويد في البرازيل وحيث أن الفيرويد إنتشرت إصابته في أصناف عديدة أصبح الفيرويد عام وسمى فيرويد أصفر الكوليس Coleus Yellow (CYVd) Viriod. ولقد ظهر هذا الفيرويد في كندا سنة ١٩٩٠ على نباتات الكوليس نتيجة إنتقاله من البرازيل أو الولايات المتحدة ولقد درس دراسة وافية في كندا.

وفي سنة ١٩٩٠ ذكر العالم Spiker et al وجود فيرويد في نبات *Coleus blumi* في ألمانيا وأخذ اسم مؤقت هو Coleus blumi Viroid 1 (CbVd - 1) ولا يزال هذا الفيرويد تحت التجربة والدراسة.

١ - فيرويد إصفر الكوليس

(CYVd) Coleus Yellow Viroid

مقدمة :

درس هذا الفيرويد دراسة وافية في كندا وقد إتفق الباحثون على أن هذا الفيرويد الذى فى كندا هو نفسه الذى ظهر فى البرازيل ويمكن أن يكون الفيرويد قد دخل كندا عن طريق البذور المصابة المستوردة من أمريكا خاصة منطقة كوستاريكا حيث

تتراوح الإصابة في أمريكا بنسبة ١٦ - ٦٨٪. وبسبب أن نباتات الكوليس في كندا أصلها من بذور متحصل عليها من اليابان وأقطار أوروبا، أجريت محاولات لتحديد فيما إذا كان الفيرويد قد إنتقل خلال بذور الكوليس.

ينتقل الفيرويد من نباتات الكوليس إلى نباتات الريحان *Ocimum sanctum* بالطرق الميكانيكية والتطعيم. البذور الناتجة من نباتات الكوليس المصابة واختبرة بواسطة طريقة R - PAGE ظهر أنها تحتوي الفيرويد. وكذلك فإن الفيرويد موجود في البذور الساكنة حوالي ٣٢٥ ميكوغرام في كل بذرة، كذلك فإن البذور المنبتة حديثاً تحتوي على الفيرويد. تتراوح معدلات الانتقال في النبات من ٧١,٤٪ في النموات الحديثة من البذور إلى ٦٧,٣٪ في البادرات. يوجد الفيرويد في أجزاء الزهرة وفي إندوسبيرم بذور الكوليس ولا يوجد في غلاف البذرة. من بين ١٦ جنس من نباتات الزينة التي إختبرت لمعرفة قابليتها للإصابة بفيرويد إصفرار الكوليس تبين أن جنسين فقط قابلان للإصابة بالفيرويد هما جنس *Colons* و *Hypocyrta*. كذلك إختبرت خمسة أصناف من الكوليس تنتشر زراعتها في الحدائق لمعرفة قابليتها للإصابة بالفيرويد وهذه الأصناف هي - الأخضر - الأرجواني - الأحمر - الخملي (القطيفين) والقرمزي. يوجد أن هذه الأصناف كلها قابلة للإصابة بالفيرويد باستثناء الصنف الأخضر فقط الذي لا يصاب.

إنتقال الفيرويد:

ينتقل الفيرويد ميكانيكياً وبالتطعيم إلى البادرات ويمكن اكتشافه في البادرة بعد ثلاثة أسابيع من الحقن ولكن يكون التركيز منخفض فيها، يزداد التركيز بتقدم العمر ويصل إلى أعلى مستوى له بعد خمسة أسابيع من الحقن. كذلك يمكن نقل الفيرويد بالتطعيم على نوع واحد من نباتات الريحان *O. sanctum* وكانت نسبة نجاح الانتقال ١٣٪. أما الانتقال بالطريقة الميكانيكية على بادرات الريحان كانت بنسبة نجاح ١٦٪ ٢٩٪. عند نقل الفيرويد بالتطعيم فإن النباتات المطعمة كان وجود

الفيرويد فيها فى فرعين فقط من بين ستة فروع، هذا يدل على التوزيع غير المنتظم للفيرويد فى النبات. وكذلك فإنه عند حقن البادرات الصغيرة بالفيرويد لم يظهر على هذه البادرات أعراض بعد ٣ أسابيع ولكن ظهرت الأعراض بعد ٨ - ١٠ أسابيع من الحقن. لم يكن هناك أعراض مرئية على النباتات المصابة. كذلك لم يمكن نقل الفيرويد إلى البطاطس أو الطماطم أو *S. sinensis* بواسطة التطعيم أو الحقن الميكانيكى.

طبيعة الفيرويد:

يتكون فيرويد الإصفرار فى الكوليس (CYVd) *Coleus Yellow Viroid* من حمض نووى RNA أحادى الخيط ويكون فى الهجرة الكهربائية أسرع من فيرويد الدرة المغزلية فى البطاطس. أما عن إنتشار الفيرويد فى نبات الكوليس، فقد وجد أن الفيرويد يمكن اكتشافه فى الصنف الأرجوانى، القرمزى، القبطى فى كل من أجزاء الزهرة، الثمرات الحديثة والأفرع المختلفة من نبات الكوليس جدول ٥٥. وكذلك فإن بذور هذه الأصناف الثلاثة تحتوى فيرويد. أما محتويات البذرة من الفيرويد، فقد وجد أن الصنف الأرجوانى يحتوى فيرويد فى البذور الكامنة (بنسبة ١٦ بذرة من ٢٤ بذرة) ٦٦,٦٪ من البذور تحتوى فيرويد. أما الصنف القرمزى والأخضر والقبطى تنخفض فيها نسبة الفيرويد حتى تصل إلى الصفر فى الصنف الأخضر. أما بالنسبة لغلاف البذرة فلم يكتشف فيه الفيرويد فى أى صنف من أصناف الكوليس. أما الأندوسبيرم والجنين فيوجد فيهما الفيرويد فى الصنف الأرجوانى فقط بنسبة ٩٠٪ من البذور المختبرة. كذلك فإن وجود الفيرويد فى البذور المنتجة كان فقط فى الصنف الأرجوانى بنسبة ٧١,٤٢٪. أما عن وجود الفيرويدات فى البادرات كان أيضاً فى الصنف الأرجوانى فقط بنسبة ٦٧,٣٤٪.

جدول ٥٥ : توزيع الفيرويد في النباتات الناتجة من تكاثر خضري.

أجزاء النبات	الأصناف المختبرة. عدد النباتات الموجبة للاختبار على عدد النباتات المختبرة			
	القطيفي	القرمزي	الارجواني	الأخضر
الفروع الحديثة	٢/٢	٤/٤	٢/٢	١/١ صفر
الأغصان	٧/٧	٥/٥	١٢/١٥	—
سبلات الأزهار	١/٢	٢/٢	٢/٢	٢/٢ صفر
بتلات الأزهار	١/٢	٢/٢	٢/٢	٢/٢ صفر
متوك الأزهار	١/٢	٢/٢	٢/٢	٢/٢ صفر
عضو الثأيت في الزهرة	١/٢	٢/٢	٢/٢	٢/٢ صفر
البدور الساكنة	٣/٥	٢/٥	٤/٥	١/٥ صفر

لم يثبت وجود الفيرويد في بدور الريحان. إن كمية وجود الفيرويد في بدور الكوليس تقدر بحوالي ٣٢٥ ميكروغرام في كل بذرة وهذه النسبة العالية في البذور تجعل من السهل اكتشافه ودراسته فيها.

ب - فيرويد كوليس بليومس رقم ١

Coleus Blumei Viroid - 1

إن دراسة تتابع النيوكلييتيدات الكامل في فيرويد اصفرار الكوليس المعزول من *Solenostemon scutellarioides* أظهر أن هذا الفيرويد يتكون من ٢٤٨ نيوكلييتيدة والتي تأخذ شكل عصوي في التركيب الثانوي للفيرويد عندما تنشئ بأقل طاقة حرة. إن مقارنة تتابع فيرويد اصفرار الكوليس مع فيرويد كوليس بليومس رقم ١ (CbVd - 1) المعزول في ألمانيا بين أن هذين الفيرودين بينهما علاقة قريبة جداً. إن الاختلافات بين الفيرودين موجود في ثلاثة مواقع فقط هي: الموقع الأول في مركز ٢٥ حيث تزال منه قاعدة U، والموقع الثاني هو مركز ٢٦ حيث تستبدل

قاعدة U وتحل محلها قاعدة A. أما الموقع الثالث فهو مركز ٢٤١ حيث تغرز قاعدة A. هذا يعني أن الفيروسين فيها نفس عدد النيوكليوتيدات ٢٤٨ والاختلاف فى ثلاثة مواقع فقط ولقد صنف هذين الفيروسين فى تحت مجموعة B₃ من الفيروسات.

إن فيروس إصفرار الكوليس (CYVd) كان أول وصف له على أنه فيروس كامن فى نبات *S. scutellarioides* وهذا الاسم مرادف لاسم *Coleus blumei* فى البرازيل. ولقد تم إختيار هذا الفيروس الموجود فى البرازيل والموجود فى كندا فوجد أنهما فيروس واحد. أما فيروس كوليس بلومى (CbVd - 1) فقد عزل من نفس النبات *scutellarioides* فى ألمانيا ودرس ترتيب نيوكليوتيداته بواسطة Spiker et al سنة ١٩٩٠ ووجد أنه مماثل لفيروس إصفرار الكوليس فى حجم الجزيء وأن التتابع الكامل للتركيب الثانوى للفيروس فى شكل ٧٩. وتحليل التتابع وجد أن الحمض النووى RNA للفيروس CYVd يتكون من ٢٤٨ نيوكليوتيدة بنسبة G + C إلى A + U تساوى ١,٢٣. وأن نسبة ٧١٪ من النيوكليوتيدات فى أزواج قواعد وهى ٥٤ زوجة من G مع C و ٢٩ زوج من A مع U و ٥ زوج من G مع U وأن التركيب الثانوى لهذا الفيروس الذى حدد حسب ما ذكره Zuker et al سنة ١٩٨٩ يكون لولبى (حلزونى) بشكل عصوى مشابه لبقية الفيروسات الأخرى. عند مقارنة تتابع نيوكليوتيدات الفيروس CYVd مع الفيروس CbVd - 1 تبين أنهما متشابهان بنسبة ٩٨,٩٪ من تزاوج النيوكليوتيدات، وأن الاختلاف فى ثلاثة مواقع كما ذكر سابقاً. كذلك وجد أن الطفرات كلها تتواجد فى جانب جزء اليد اليمنى من جزيء الفيروس، وإن اختلاف تتابع النيوكليوتيدات الذى هو ١,١٪ بين تركيب جزيئى الفيروسين لا يسبب أى اختلاف معنوى فى الشكل الثانوى للفيروسين. إن شدة القرب والتشابه بين الفيروسين يؤدى إلى القول بأن الفيروسين إما نشأ من مكان جغرافى واحد أو خرجا من عمليات تطور متشابهة الأصل.



شكل رقم ٧٩ :

رسم يبين ترتيب النيوكليوتيدات والتركيب الثانوي للفيرويد CYVd المعزول من *S. acutellarioides*. النيوكليوتيدات المختلفة الملاحظة بين الفيرودين CYVd و ١ - CbVd مشار إليها بالأسماء. المنطقة المحاطة بمستطيل هي المنطقة المحفوظة المركزية.

الفصل السابع

فيروسات مجموعة A

تحت مجموعة ASBVd

١ - مرض ضربة الشمس فى الأفوكادو

Avocado Sunblotch Disease

مقدمة :

يسمى نبات الأفوكادو باللغة العربية الفصحى باسم الزبدية ونظراً لعدم شيوع هذا الاسم العربى فإننا نستخدم الاسم الحرفى الأجنبى وهو افوكادو. لوحظت أعراض مرض ضربة الشمس فى الأفوكادو سنة ١٩٢٨ وكان يعزى إلى مسبب فيروسى ولقد انتشر فى كاليفورنيا منذ سنة ١٩٣١ ولقد وصف أعراضه Home & Parker وقالوا إن مرض ضربة الشمس مرض فيروسى خطير يصيب نبات الأفوكادو *Persea americana*. استمرت الأبحاث على هذا المرض لغاية سنة ١٩٦٢ وأكدت الأبحاث أنه مرض يتسبب عن فيروس وإن هذا الفيروس ينتقل بالتطعيم وبالبذور، إلا أنه لم يذكر أية صفة أخرى عن هذا الفيروس ولم يمكن عزله أو دراسة صفاته وذلك لصعوبة العزل وبقاء المسبب حياً. وبقي الحال على ما هو عليه من هذا الاعتقاد حتى سنة ١٩٧٠ حيث ظهرت أعراض لهذا المرض فى استراليا، وفى هذه الفترة كان فجر علم جديد للفيروس قد إفتتح من قبل

العالم Diener فتشكلت ثلاثة مجموعات من العلماء في استراليا لبحث ودراسة هذا المرض وكانت هذه المجموعات تتكون من:-

المجموعة الأولى Peter Palukaitis et al

المجموعة الثانية J.L. Dale and R. N. Allen

المجموعة الثالثة Mohamed Ali and Wayne Thomas

أجريت الدراسات على مسبب مرض ضربة الشمس في الافوكادو بأن عزلت جميع الأحماض النووية منخفضة الوزن من الأشجار المصابة والأشجار السليمة، وتبين أن مسبب المرض هو حمض نووي ذو وزن جزيئي $(6 - 7) \times 10^4$ دالتون ووصف بأنه ذو شكل دائري ومقاوم للتبييط بالحرارة، وكان يعزل من بعض الأشجار مع أنها لا تظهر أعراض وسميت حاملة للمسبب Carrier وغير مظهرة للأعراض Symptomless. ولقد تبين أن مسبب مرض ضربة الشمس في الافوكادو ذو وزن جزيئي أصغر من الوزن الجزيئي لفيرويد تقزم الأقحوان وفيرويدات الحمضيات وإن التحليل باستعمال طريقة التهجين وباستعمال cDNA معلم بالفسفور المشع دل على أن هذا المسبب يتكون من RNA أحادي الخيط ولقد أمكن اكتشاف المسبب بعملية التحليل السابقة. ولقد تأكد أن مسبب المرض موجود في ١٢ شجرة من الافوكادو حيث أعطت نتيجة إيجابية للفهرسة وللاختبارات البيولوجية لمرض ضربة الشمس. إن العلاقة الكاملة بين مرض ضربة الشمس ووجود مسبب المرض دل على أن اختبار تهجين cDNA يمكن أن يستعمل في فهرسة هذا المرض وإن إجراءات الكشف هذه تحتاج ٥ أيام، أما إجراءات الكشف بالطرق البيولوجية تحتاج سنتين.

إن مستوى مسبب مرض ضربة الشمس في مستخلص الأحماض النووية المنقى جزيئياً من عدد مختلف من مصادر أوراق الافوكادو المصابة بالمرض يختلف (مثلاً حوالي ١٠٠٠٠ جزء) من ٢,٢٪ إلى 2×10^{-5} ٪ بالوزن وإن الحد المنخفض

الممكن اكتشافه بواسطة اختبار التهجين يقدر بحوالى ١٠-٧٥٪ بالوزن وهذا يساوى على الأقل ٣١٠ أكثر حساسية من اكتشاف المسبب المرضى بواسطة PAGE لمستخلص الحمض النووى من الورقة.

بعد هذه النتائج استطاعت المجموعات الثلاثة المكلفة بدراسة المرض من إثبات أن المرض يتسبب عن فيرويد وذلك سنة ١٩٧٧ وسمى هذا الفيرويد باسم فيرويد ضربة الشمس فى الأفوكادو Avocado Sunblutch Viroid ويكتب باختصار (ASBVd).

الأعراض:

تظهر أعراض مرض ضربة الشمس فى الأفوكادو على السيقان والفروع الخضراء للنباتات المصابة على شكل خطوط صفراء اللون كما تظهر على الثمار خطوط صفراء إلى حمراء اللون. الأعراض التى تظهر على السيقان والثمار هى الشائكة ومن السهل تمييزها. غير أن الأوراق قد يعتريها تشوه بسيط وإبيضاض العروق واصفرار وتظهر فى مراحل أخرى من الإصابة أوراق متبرقشة. الأشجار المصابة تتدلى فروعها وتتقزم أحياناً.

ولقد ذكر Thomas & Mohamed سنة ١٩٧٩ أن المرض فى استراليا يحدث بمظهرين، المظهر الأول أشجار تظهر عليها أعراض مميزة على الثمرة والقلب وإن نسبة بسيطة ٢ - ٥٠٪ فقط من ثمار هذه الأشجار يكون فيها بذور تحمل مسبب المرض. أما المظهر الثانى فهو عبارة عن أشجار تكون حاملة للمرض وغير مظهرة للأعراض وتسمى حاملة أو ناقلة بدون أعراض Symptomless Carriers. هذه الأشجار لا يظهر عليها أعراض سواء على الثمرة أو القلب ولكن الأعراض سوف تتكشف على القلم الذى يستعمل طعماً عليها. إن ٨٦ - ١٠٠٪ من الثمار المأخوذة من هذه الأشجار الحاملة بدون إظهار أعراض، تحمل مسبب المرض، ومع ذلك فإن البادرات من هذه البذور تكون أيضاً حاملة للمرض بدون أعراض إلا أنه

عند تطعيمها بقلم سليم (مأخوذ من أشجار سليمة) فإن نموات هذا القلم سوف يتكشف عليها أعراض المرض.

وبشكل عام يمكن تمييز أعراض المجموع الخضري على شكل نوعين من الأعراض المرئية، النوع الأول تبرقش الأوراق وتلونها بدرجات مختلفة من الأخضر حتى الأصفر وهذا العرض يتسبب عن سلالة أو تنوع معين. والنوع الثاني إبيضاض عروق الأوراق حيث يظهر حامل الورقة والعرق الرئيسي والتفرعات الجانبية له بيضاء وقد يحدث تشوه في قمة الورقة أو قاعدة النصل، وهذا العرض يتسبب أيضاً عن سلالة أو تنوع آخر وسوف نتكلم بالتفصيل عن هذه التنوعات (السلالات) فيما بعد إن شاء الله.

أما بالنسبة للبلاستيدات الخضراء فيظهر فيها عدم تعضي كامل وتوقف تام كلية في المناطق الصفراء أما المناطق الخضراء تستمر سليمة عادية. بالفحص الميكروسكوبى تبين أنه في المناطق الصفراء ينخفض ترتيب الجران - Granas rearrangement في نصل الورقة ويظهر إنتفاخ في العضيات ويتكون فجوات ويتواجد قليل من Paramural bodies في الخلايا السليمة ولكن يتكون منها الكثير في المناطق الصفراء ويتغير تعضيها الداخلى.

تعاقب تكشف الأعراض بعد الحقن بأنسجة مصابة بضربة الشمس:

The Progression of Symptoms Development After Ioculation With Sunblotch - infected Tissues

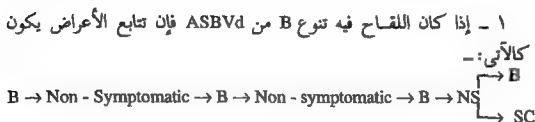
إن تثبيط إنتشار الفيروس ضمن نسيج ورقة مظهرة أعراض الابيضاض وارتباطه فى حركة غير محددة فى كل من الأنسجة المبرقشة والحاملة للفيروس بدون أعراض يؤدى إلى القول باحتمال حدوث إنعزال فى تجمعات الفيروس وتكوين تنوعات، هذه التنوعات المفترضة لفيروس ASBVd يمكن أن تكون ظهرت عن طريق التفاعل مع العائل.

إن إنعزال تنوعات ASBVd الذى يحدث فى الافوكادو يمكن أن يكتشف أو يحدد بواسطة أعراض مميزة ومحددة. نظراً لأن إنتقال مرض ضربة الشمس بواسطة مستخلصات الأنسجة بالإضافة إلى الفيرويد النقى صعب جداً ويحصل عليه بصعوبة وغير متوقع، لذا يلجأ إلى استعمال نسيج مصاب وينزع فى النبات (نوع من التطعيم)، وبالتالي فإن أية تأثيرات تحدث بواسطة تنوعات أو عزلات (أى أنواع للفيرويد) ذات التركيزات المنخفضة من تجمعات ASBVd مثل تنوع ASBVd - B يكون عندها فرصة كافية للتعبير عن نفسها بالأعراض التى تحدثها.

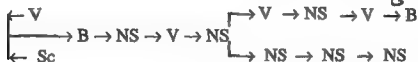
إن دليل نجاح إنتقال الفيرويد بواسطة الطريقة السابقة يكون بواسطة التعريفات المنظورة للأعراض وبواسطة الكشف بطريقة sPAGE وهذه تحدث فى ٣ - ٨ شهور. فى جميع الحالات، بغض النظر عن مصدر اللقاح، فإن أعراض المجموع الخضرى الأولية هى إبيضاض الأوراق، بعد هذا الظهور يمكن أن يستدل بأن تنوع الفيرويد ASBVd - B موجود فى جميع تجمعات الفيرويد حتى عندما تكون مغطاة Masked عند الكشف بواسطة sPAGE بمستويات عالية من تنوعات ASBVd - V و ASBVd - Sc. كلما تقدم نمو الافوكادو المحقون بنسيج مبيض فإن أعراض الإبيضاض تظهر على فترات غير منتظمة.

أما النباتات التى حصل لها حقن من نسيج مبرقش أو نسيج حامل غير مظهر للأعراض، يتكشف أساساً أعراض تبرقش الورقة. إن التحليل بواسطة sPAGE أظهر على أن ASBVd - V يصبح التنوع السائد فى الأشجار المصابة، هذا يكون متوافق مع سيطرة وانتشار أعراض التبرقش. مع استمرار الإصابة لأكثر من سنة فمن المحتمل إعادة اكتشاف فروع حاملة بدون أعراض تحتوى ASBVd - Sc من سيقان التى لا تزال مظهره أعراض التبرقش. من هذه الفروع فإن النباتات الحاملة بدون أعراض التى نتجت لم تظهر تعبيرات الأعراض المرضية أبداً حتى مع وجود معيار عالى من الفيرويد فى نسيج المجموع الخضرى.

يمكن رسم تناوبات الأعراض كالآتي:-



٢ - إذا كان اللقاح فيه تنوع V أو تنوع Sc من ASBVd فإن تناوب الأعراض يكون كالآتي:-



ملاحظة إن NS تسمى «Non - symptomatic».

مسبب المرض:

يتسبب مرض ضربة الشمس في الأفوكادو عن فيروس ضربة الشمس في الأفوكادو (Avocado Sunblotch Viroid (ASBVd) (وكان يكتب قبل سنة ١٩٩٢ بدون حرف d). يتكون الفيروس من ٢٤٧ نيوكليوتيدة ولكن بعض عزلاته أو تنوعاته تصل إلى ٢٥١ نيوكليوتيدة.

إن هذا الفيروس يمتلك موقع فريد بين الفيروسات. من ناحية التركيب فإنه يمتلك تماثل تناوب محدود بالنسبة للفيروسات الأخرى، ومن ناحية وظيفية فإن ASBVd هو الفيروس الوحيد الذي ذكر عنه بأن نسخ ال RNA الخاصة به تتوالد في المعمل (تسخن) من كلونات cDNA وقابلة لأن تصنع في أماكن خاصة في غياب الأنزيمات. مع أن التناوب المتغير بين العزلات المختلفة من ASBVd قد اقترحت، إلا أن تناوب العزلات الأسترالية فقط من هذا الفيروس هي المعروفة والمحددة جيداً. وقد تحدد تناوبات جميع العزلات الأسبانية من فيروس ASBVd المتحصل عليها من أشجار الأفوكادو نوع Fuerte المظهرة أعراض هذا المرض. وسواء في

تتابعات العزلات الأسترالية أو العزلات الأسبانية فقد تبين أن جميع التتابعات المختلفة لوحظت في العروتين الطرفيتين من الجزيء ولكن ليس في جزيئه المركزي والذي يبدو أنه مشمولاً في التجهيز الذاتي لأنواع RNA السالبة والموجبة من الفيروس ASBVd. إن ظهور تماثل تتابع عالٍ يساوي أو أكثر من 7.98 في عزلتين مأخوذتين من أسبانيا وأستراليا (مناطق جغرافية مختلفة) يؤدي إلى القول أو التأكيد بأن الأصل مشترك لكلا العزلتين وأن منشأهما واحد.

فيروس ضربة الشمس في الأفوكادو:

لقد وصف فيروس ضربة الشمس في الأفوكادو ASBVd بأنه تركيب شبه عصوي من RNA يتكون من 247 نيوكليotide والتي تحدث مجموعة أعراض مرض ضربة الشمس. إن هذا الفيروس يعتبر غير نموذجي وذلك بسبب تتابع نيوكليوتيداته وتركيبه. فإن التركيب الفنى بقاعدة A - U وتماثل التتابع المنخفض بالنسبة للفيروسات الأخرى يجعل الفيروس غير نموذجي. وبالتالي يمكن القول بأن ASBVd لا يتناسب مع الإجماع الذي إنفق عليه علماء الفيروس لنموذج تركيب النطاقات الموصوف من قبل العالم Keese & Symons سنة 1985. وما يقلل حدة غضب العلماء على فيروس ASBVd أن Hernandez and Flores قد ذكروا في أبحاثهما الحديثة سنة 1992 أن هناك فيروس آخر له صفات لافتة للنظر وقرينة جداً من صفات فيروس ASBVd وهذا الفيروس الجديد إسمه فيروس الموزايك الكامن في الخوخ (Peach latent mosaic Viroid (PLMVd والمستقبل القريب سيكشف لنا الكثير عن هذا الفيروس.

إن المعيار العال إلى حد بعيد من ASBVd والذي أحياناً يصل تركيبات S5 RNA للعائل هذه أيضاً صفة غير عادية بين الفيروسات. كذلك فإن المدى العائلي الضيق جداً والمحدود بشكل خاص في العائلة الغارية Lauraceae وخاصة الجنس *Perez americana* أدى إلى القول بأن هناك علاقة خاصة جداً بين الفيروس وعائلة النباتي.

فى الدراسات التى أجراها Marcos & Flores سنة ١٩٩٢ على تثبيط الفيرويد بمادة α -amanitin - تبين أن بناء RNAs الخاصة بالفيرويد ASBVd لم يتأثر باستعمال ١ أو ٢٠٠ ميكوغرام / ملتر من هذه المادة مع أن تركيز ١ ميكوغرام / ملتر يثبط أنزيم RNA Polymerase II أما تركيز ٢٠٠ ميكوغرام / ملتر يثبط أنزيم RNA Polymerase III وهذه الأنزيمات تثبط بتلك التراكيز فى جميع النباتات والحيوانات. إن عدم تأثر تكاثر الفيرويد (نسخه وبناءه) بهذه التراكيز يدل على أن نسخه وبناءه لا يعتمد على أى من هذين الأنزيمين، وبالتالي يمكن القول بأنه إما أنزيم RNA Polymerase I أو أنزيم RNA Polymerase غير محدد المعالم لهما نشاط مقاوم لمادة α -amanitin ولهما دور فى تناسخ الفيرويد إذن هذان الأنزيمان يؤثران على قالب RNA ويلعبان دوراً فى تناسخ الفيرويد ASBVd وهذه صفة جديدة لهذا الفيرويد حيث أن جميع الفيرويدات المدروسة حتى سنة ١٩٩٢ تستعمل RNA Polymerase II فى تناسخها أما هذا الفيرويد فلا يستخدمه.

إن وجود تنوعات للفيرويد ASBVd قد استدل عليها من الاختلافات فى تنابع النيوكليتيدات وتقديرات حجم الجزيء لمزلات الفيرويد. وعلى أية حال فإن هذه السلالات المقترحة أو المفترضة لم يثبت أبداً على أنها تنوعات مميزة بواسطة الاختلاف فى صفاتها البيولوجية.

ينتقل الفيرويد بالتطعيم والبذور وإن الطريقة الأساسية لانتشار المرض هو استعمال أصول حامله للمرض بدون إظهار أعراض مميزة.

كذلك فإن مقاومة المرض تكون باستعمال الأصول الخالية من وجود الفيرويد فيها وتأكيد ذلك بالعوامل التحليلية المختلفة وكذلك استعمال أقلام تطعيم خالية من الفيرويد بغض النظر عن وجود أعراض أم لا.

تمايز أعراض المجموع الخضرى فى الأفوكادو المصاب:

لقد وصف مرض ضربة الشمس فى الأفوكادو عن طريق ظهور مجموعة أعراض شديدة الاختلاف، شاملة تخطيط الساق، تلون الثمرة وتبقعها بالإضافة إلى مجموعة أعراض على المجموع الخضرى مختلفة. بالملاحظة المستمرة للأشجار

المصابة تحت ظروف الصبوا الزجاجية لعدة سنوات أصبح من الممكن تعريف نموذجين محددين جيداً ومميزين من الأعراض على المجموع الخضري. هذه الأعراض إما أن تظهر على شكل منطقة شديدة الإصفرار مترافقة مع الأنسجة الوعائية الناقلة (العروق الورقية) أو أن تظهر على شكل تبرقش (درجات مختلفة من تنوع اللون الأخضر) الذي ينتشر خلال الورقة شكل ٨٠. هذه النماذج يمكن أن توجد على الأغصان المختلفة من نفس الشجرة أو على شكل حالات منفصلة على أشجار مختلفة، وبالتالي فإن تفاعلات المجموع الخضري المميزة مع الفيروس يمكن تقسيمها إلى ثلاثة أنواع أساسية:-

- ١ - إبيضاض (إزالة اللون الأخضر) Bleached ويرمز لها الصفة B.
- ٢ - تبرقش (درجات مختلفة من اللون الأخضر) Variegated ويرمز لها V.
- ٣ - حاملة بدون أعراض (الفيروس موجود ولكن لا تظهر الأعراض) Symptomless Carrier ويرمز لها Sc.

إن أكثر الأعراض الأساسية شيوعاً لمرض ضربة الشمس في الأفوكادو هو ظهور تخطيطات في الساق، إلا أن أولى أعراض المجموع الخضري والمنتشرة كثيراً هي ظهور مناطق صغيرة محددة جيداً خالية من اللون ولها المظهر المبيض. هذا العرض لا ينتشر إلا في منطقة محددة جداً من الفرع وهي القمة النامية المفردة النشطة ولا ينتشر أبداً في بقية أجزاء الشجرة. إن مجموعة الأوراق التي تظهر هذا العرض، أحياناً يظهر عليها إبيضاض ملحوظ في أعناق الأوراق وإبيضاض في العرق الوسطى مع وجود مناطق مشوهة في قمة الورقة وقاعدتها ملاصقة للعرض الوسطى ذات نسيج مبيض.

في بعض الحالات فإن النموات الجديدة من الفروع المحتوية أوراق مبيضة أيضاً يتكشف عليها نموذج الورقة المتبرقشة الذي يشبه التبرقش الوراثي. في الأشجار المريضة الأخرى يظهر نسيج جديد سليم وغير مظهر للأعراض. من بين الأوراق المتبرقشة من الممكن أن نجد نصف ورقة يوجد عليها أعراض غير منفصلة بوضوح بواسطة العرق الوسطى عن النصف الثاني للورقة المصابة بالفيروس وغير مظهرة

للأعراض. ولقد وجد أنه من غير الممكن التمييز بين الأوراق غير المظهرة للأعراض والتي تتكشف على فروع عليها أعراض والأوراق السليمة الخالية من المرض.



شكل رقم ٨٠:

مقارنة بين ورقة سليمة وثلاثة أوراق مصابة من نبات الأفوكادو المصاب بفيريود ضربة الشمس
 a = ورقة سليمة، b = أعراض الابيضاض، c = أعراض التبرقش، d = الورقة حاملة للفيريود
 ولكن بدون أعراض.

اكتشاف فيروس ASBVd في النسيج المصاب:

لاكتشاف الفيروس ASBVd في النسيج النباتي المصاب، تؤخذ نسيج نباتية من مناطق مختلفة من الشجرة وتجري عليها الإختبارات. ولقد تبين أن المعيار العال من تركيزات ASBVd يكتشف بواسطة طريقة sPAGE والتي فيها حرف (s) يرمز إلى sequential، وهذه الطريقة تكشف الفيروس في النوعين من الأعراض في الأنسجة، الأعراض المبرقشة والأعراض المبيضة، وكذلك بهذه الطريقة يمكن اكتشاف الفيروس في مستخلصات نسيج غير مظهر للأعراض-Symptomless carrier er تابع للسلسلة المبرقشة أما إذا كان تابع للسلسلة المبيضة فإنه يكون بتركيز غير كاف لتعريفه تماماً.

كذلك تستعمل طريقة PCR amplification لزيادة حساسية الكشف من الأنسجة التي أعطت نتيجة سلبية للإختبار باستعمال sPAGE. بهذه العملية يمكن اكتشاف الفيروس من مستخلصات أنسجة من مناطق غير مظهرة للأعراض أو أوراق مبيضة بالإضافة إلى نسيج غير مظهر للأعراض من نموات حديثة على فروع أظهرت مسبقاً أعراض ولكن كان إختبارها سالب لفيروس ASBVd باستعمال sPAGE. يمكن القول بأنه يمكن اكتشاف الفيروس ASBVd بطريقة sPAGE وطريقة PCR amplification في جميع أنواع الأنسجة المحتوية فيروس. إن الفيروس ASBVd يمكن اكتشافه فقط بطريقة PCR في الأوراق غير المظهرة للأعراض الموجودة في النموات الحديثة من الفروع المحتوية أوراق مبيضة، أما الأوراق غير المظهرة للأعراض التي تكشف من فروع فيها أوراق مبرقشة، عادة تحتوي معيار عال من الفيروس يكون من السهولة اكتشافه بواسطة sPAGE. كذلك هناك علاقة مشابه بين الفيروس في الأوراق الحاملة وغير المظهرة للأعراض والأوراق المبرقشة يمكن اكتشافها في الجزء غير المظهر للأعراض الذي من الورقة المبرقشة، حيث نستطيع اعتباره نوع من النسيج الحامل للفيروس وبدون أعراض.

يمكن اكتشاف الفيرويد فى البراعم الزهرية فى الأشجار المصابة وذلك باستعمال PAGE. تستعمل البراعم الزهرية بدلاً من الأوراق كمصدر للفيرويد، وبمقارنة هذه الطريقة مع طريقة استعمال الأوراق نجد الأولى نسبة نجاحها ١٠٠٪، بينما نسبة نجاح طريقة استعمال الأوراق ٧٥٪. أما بالنسبة للوقت فتحتاج إلى ستة ساعات فقط.

تنوعات فيروسية ضربة الشمس فى الأفوكادو:

Variants of Avocado Sunblotch Viroid

إن تحليل التتابع المقارن لتجمعات الفيرويد المتكونة طبيعياً قد شاركت بشكل معنوى فى زيادة معرفة هذا الفيرويد وعلى أساس هذه الدراسات قد اقترح نموذج للفيرويد مقسم إلى نطاقات من حيث التركيب والوظيفة واقترحت مساهمة هذه النطاقات فى تطور الفيرويد. إن فيروسية ضربة الشمس فى الأفوكادو فيه قليل من تماثل التتابع بالنسبة للفيرويدات الأخرى ويعتبر شاذ من هذه الناحية ويوضع فى التصنيف فى صف منفصل لوحدة من الفيرويدات. زيادة على ذلك فإن فيه صفة أخرى لم تشترك معه فيها الفيرويدات الأخرى وهى مقدرة نسخ RNA للفيرويد بأن تتناسخ فى المعمل من كلونات Dimeric cDNA من الخيط الموجب والسالب للفيرويد، كذلك صفة الإنشطار الذاتى فى مواقع مخصصة فى غياب الأنزيمات.

باستعمال طريقة التحليل Fingerprint ثنائية الاتجاه مرتين للفيرويد ASBVd المنقى والمهضوم بأنزيم RNase البنكرياسى و T₁ أدى إلى القول بأن هناك تنوعات التتابع موجودة فى الفيرويد. زيادة على ذلك فإن هذه النتائج قد دعمت بالدنطرة الحرارية لـ Profiles من هجين cDNA : ASBVd RNA متماثل وآخر المفترض أن يكون غير متماثل، ولقد تبين وجود عزلتين ذات ٢٤٧ نيوكليوتيدة. ولقد ذكر

Pallas et al سنة ١٩٨٨ وجود عزلة مميزة واضحة بأقل تغيير فى القواعد فى العروات الطرفية اليمنى واليسرى من الجزئ عند مقارنتها مع التنوع الأصلى للفيروسىد والمسمى 1-SB. ولقد ذكر Rakowski & Symons سنة ١٩٨٩ أن هناك ١٦ تنوع جديد من عزلات حصل عليها من ثلاثة أشجار أفوكادو من مناطق متفرقة.

عند تنقية فيروسىد ASBVd حسب طريقة Palukaitis & Symons من أوراق أشجار مظهره أعراض مرضية مختلفة أو حاملة وغير مظهره للأعراض وجد أن هناك ثلاثة عزلات A، B، C. العزلة A فيها تتابع ٢٣ كلونة كاملة من cDNA ولها ستة تنوعات أما العزلة B فيها تتابع ١١ كلونة كاملة من cDNA ولها عشرة تنوعات. وقد استعملت التحضيرات النقية من الفيروسىد لتوليد كلونات cDNA للفيروسىد ASBVd من كل عزلة باستعمال لثنين من ال Primers المصنعة من Oligonucleotid. البرايمر الأول فيه ٢٢ قاعدة وهو 5'- d (TCGGAACAGACCTGGTTTCGTC) - 3' والى تتجهن أطرافه مع مركز ٤٢ - ٦٣. أما البرايمر الثانى الذى يستعمل لتصنيع الخيط الثانى فيتكون من ١٩ قاعدة 19-mer oligonucleotid وهو 5'- d (CTTCCGACTCTGAGTTTC) - 3' وهذا يتوافق مع الأطراف ٦٤ - ٨٢. ولقد استعمل زوج آخر من البرايمرز الأول لبناء الخيط الأول والثانى لبناء الخيط الثانى من الحمض البادئ الأولى. وهذه البرايمرز هى 3'- d (TCTTTCCCTGAAGAGACGA) - 5' والثانى 3'- d (TGGGAAGAACACTGATGAG) - 5'.

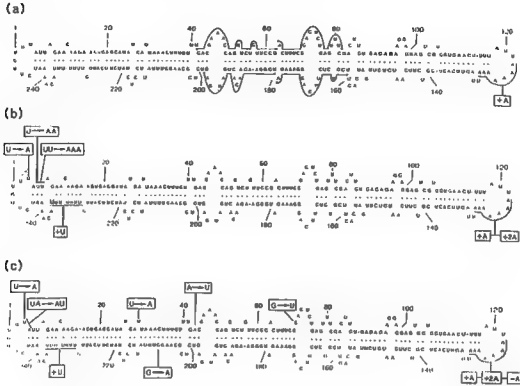
من بين ٥١ كلونة كاملة لـ cDNA محضرة من ثلاثة عزلات أمكن الحصول على ١٧ تنوع مختلف من ضمنها العزلة الأصلية 1-SB جدول رقم ٥٦ إن تتابع العزلة الأصلية ASBVd - 1-SB وجد فى ١٩ من ٢٣ كلونة لـ cDNA محضرة

من عزلة A والأربعة كلونات الباقية من cDNA كانت متماثلة مع بعضها ومختلفة عن تتابع SB-1 عن طريق زيادة A مفردة في المنطقة الممتدة من طرف A بين ١٢٢ - ١٢٨ والتي فيها سبعة A (شكل ٨١، a). جميع كلونات cDNA المحضرة من عزلة B و C تختلف عن تتابع SB-1 بتغيير في النيوكليوتيدات، دخول نيوكليوتيدات أو إزالة على تسعة مناطق ممكنة (شكل ٨١، b، c). إن قاعدة واحدة مفردة $A \rightarrow U$ تغيرت على الطرف ٢٩ كانت موجودة في ثمانية من ٩ كلونات مختلفة من cDNA متولدة من عزلة C ولكن ليست في التنوع من عزلة A و B. إن هذا التغير $A \rightarrow U$ على أطراف ٣ - ٦ وجدت في جميع كلونات cDNA المتولدة من عزلة B، علاوة على ذلك في إثنين فقط من عزلات C. في كلونات cDNA لكل من عزلات B و C فإن نيوكليوتيدة A المتعددة الموجودة بين طرفي ١٢٢ - ١٢٨ وكذلك U المتعددة والممتدة بين طرفي ٢٣٠ - ٢٣٦ تظهر تنوع في الطول عن طريق إضافة وحذف في الأطراف في (شكل ٨١، b، c).

إن التنوع المتمثل بواسطة كلونات cDNA من عزلات A، B، C يختلف في الحجم من ٢٤٦ إلى ٢٥١ نيوكليوتيدة. هناك إختلافات مماثلة لما في هذا الفيرويد تحدث في فيروسات أخرى مثل تنوعات فيرويد أكسوكورتر الحمضيات (يعني تختلف التنوعات في الأطوال) حيث تنوعاته من ٣٧٠ - ٣٧٥ نيوكليوتيدة، أما تنوعات فيرويد الدرنه المغزلية في البطاطس فهي ثابتة الحجم ٣٥٩ نيوكليوتيدة.

إن التركيبات الثانوية المتوقعة للتتابعات المتولدة من عزلة B محتوية AA $U \rightarrow$ وكذلك AAA $UU \rightarrow$ في مراكز خمسة وستة (شكل ٨١، b). هذا سيؤدي إلى الحصول على عروة في اليد اليسرى أوسع من تلك الموجودة في التنوع الأصل SB-1. التركيبات الثانوية المتوقعة لجميع التنوعات تكون بشكل أساسى معتمدة على التنوع SB-1 (شكل ٨١، a).

فيروسات مجموعة A



شكل رقم ٨١ :

الاختلافات في التنوعات من حولات فيروس ASBVd متمثلة في c, b, a .
 c : تدل على التركيب الثانوي المفترض للعزلة الأصلية SB-1، النيوكليوتيدات المتغيرة موضوعة في مستطيلات والسهم يدل على حلول الثانية بدل الأولى.
 a : تبين الأربعة مراكز البادئة في مركز الجزيء والمستعملة في توليد كلونات cDNA.
 a, b, c : تبين النيوكليوتيدات في نهاية أليد اليمنى واليسرى من الجزيء وتبين مواقع الإضافة أو الحذف أو الإحلال وتبين زيادة الحجم في U و A.

وعلى عكس ما هو مشابه في مواقع التتابع المختلفة في تنوعات فيروسد اكسوكورتز الحمضيات وفيروسد الدرنه المغزلية في البطاطس، فإن النهاية الطرفية لليد اليمنى واليسرى في جزيء ASBVd هي مجموعة من النيوكليوتيدات المختلفة. إن مناطق التتابع المختلفة في تنوعات PSTVd و CEVd موجودة في المناطق الممرضة

والتغيرة وهي Pathogenic and Variabe Regions. هذه المناطق تكون على أى طرف من المنطقة المركزية المحفوظة فى الفيرويدات الشبيهة بالفيرويد PSTVd ولكنها غير موجودة فى ASBVd.

إن عزلات B و C تتكون من مخلوط معقد من التنوعات بالمقارنة مع عزلة A التى فيها تنوعين فقط قد عرفا فى تتابع ال ٢٣ كلون من cDNA (شكل ٨١). من كلونات cDNA المتولدة من عزلات B و C هناك أكثر من النصف تمثل تنوعات مختلفة ومواقع متشابهة وجدت مع عزلتين فقط من عزلات CEVd والذى ذكر وصفه بأسهاب فى حالة عزلة CEVd - J. هناك تسعة تنوعات وجدت فى تتابع ال ١١ كلون كامل من cDNA، بينما أربعة تنوعات وجدت فى تسعة كلونات كاملة من cDNA من عزلة CEVd - DE 30.

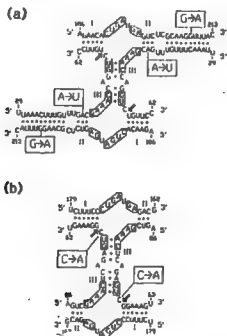
ومن المهم أن نذكر أنه من بين ال ٤١ موقع المتغير فى ١٦ تنوع بالنسبة لتتابع العزلة الأصلية SB - 1 فإن إثنين فقط لم تدخل فى الحذف أو الإحلال من U و / أو A. إن تنوعات C - 9 تحوى A → G أما تنوع C 10 فيحوى G → U (إحلال)، بينما مواقع C لم تدخل فى أى تعديلات. إن إحلال A → U محور سائد فى ٢٢ من ٤١ موقع تغيير.

إن تنوعات عزلة C تحوى نيوكليوتيدات متغيرة فى المنطقة المحددة بالبوادئ المستعملة لتحضير أول مجموعة من كلونات cDNA. هذه النتيجة تؤكد ضرورة تتابع المناطق دائماً تحت البرايمرز فى حالة حدوث علم موافقة. هذه الاختلافات تحدث ضمن تتابع التركيبات الثانوية لرأس المطرقة الموجب والسالب المزدوج والذى هو ضرورى للانتشار الذاتى فى جزئ ASBVd فى المعمل شكل ٨٢، ولكن لاتتضمن تلك القواعد المحفوظة بشكل كامل بين إنشطار ذاتى آخر ل RNAs محتوية تركيب رأس المطرقة.

بالنسبة لتنوع C - 10 فإن تغير النيوكليوتيدات U → G على موقع ٧٠ يكون على مكان الانشطار الذاتى للخييط السالب RNA (شكل ٨٢، b). وعلى أية حال فإن نشاط عملية الإنشطار الذاتى خلال النسخ ل RNA سالب للتنوع C - 10 كان

مشابهاً ٧.٥٥ تقريباً للنسخ للخطط السالب RNA في SB - ١ باستعمال كلونات cDNA Dimeric.

ومن المسلم به أن أى من هذه التنوعات يمكن أن يكون نتيجة لحدوث نسخ خطأ أثناء بناء cDNA، لأننا لو أردنا أن نتأكد عملياً من ال ٥١ كلونة المنسوخة من cDNA باختبار كل واحدة على حدة لاحتاج الأمر إلى سنتين أو أكثر. وبالنسبة لتنوع C-16 و C-17 فإن الإنشطار الثانى فى المعمل هو نتيجة للعمل ولكن يمنعها من تمثيل تنوع التتابع الذى يحدث طبيعياً نظراً لأن الإنشطار الثانى يعتبر بأنه يلعب دوراً هاماً فى تناسخ ASBVd. واعتماداً على أبحاث Semancik سنة ١٩٩٤ فإن تنوع ASBVd - Sc يشابه ASBVd - SB1.



شکل رقم ۸۲:

نموذج تركيب لاثوى لرأس المفرقة المضاضف لمواقع الانشطار الذلى الموجبة والسالبة
فى 1-ASBvd-SB وتغير القاعدة المفردة الموجود فى تنوعات C-9 موجب (a) و
C-10 السالب (b). إضافة روابط هيدروجينية محيطة جانية تربط الساق فى مراكز ٢٩ -
٤٠. التحول من A → G يتغير فى موقع ٢٠A مشمولاً فى شكل (a). النيوكليوتيدات الموضوعة
فى مستطيلات هى المحفوظة بين جميع RNAs ذلى الانشطار المشابهة. أما أرقام I, II, III
والأسماء فليها تدل على الروابط الهيدروجينية التى تربط السيقان ومواقع الانشطار. وهما أيضاً
مخفظة عن التركيبات لشبه رأس المفرقة فى التتابع السالب، فى نفس رقم ومركز النيوكليوتيدة
تكون متباعدة كما فى التتابع الموجب.

جدول ٥٦: توضيح مختصر للتغير النيوكلوتيدات في التتوعات المتحصل عليها من عزلات فيروسات ضرية الخمس في الألفاكانو A، B، C بالمقارنة مع العزلة الأصلية SB-1.

عزلة الفيروس	نوع التتابع	عدد كابتات cDNA التي لها نفس التتابع	أرقام النيوكلوتيدات التي في العزلة الأصلية SB-1 والتي يحدث لها تغير	عدد النيوكلوتيدات في ندرع التتابع
A	A-1	١٩	—	٢٤٧
	A-2	٤	١٢٢ - ١٢٨ +A	٢٤٨
B	B-1	١	٣ U→A ٥ U→AA	٢٤٩
	B-2	١	٢٣٠ - ٢٣٦ +U ٣ U→A ٥ U→AAA	٢٥١
	B-3	١	١٢٢ - ١٢٨ +A ٢٣٠ - ٢٣٦ +U ٣ U→A ٥ U→AA	٢٥١
	B-4	٥	١٢٢ - ١٢٨ +2A ٢٣٠ - ٢٣٦ +U ٣ U→A	٢٤٨
	B-5	٢	٥ - ٦ UU→AAA ٣ U→A ٥ - ٦ UU→AAA	٢٤٩
	B-6	١	٢٣٠ - ٢٣٦ +U ٣ U→A ٥ - ٦ UU→AAA	٢٤٩
C	C-1	١	١٢٢ - ١٢٨ +A ١٢٢ - ١٢٨ +A	٢٤٨
	C-2	٤	٢٩ U→A	٢٤٧
	C-3	٢	٢٩ U→A	٢٤٨
	C-4	١	١٢٢ - ١٢٨ +A ٢٩ U→A	٢٤٦
	C-5	٢	١٢٢ - ١٢٨ -A ٢٩ U→A	٢٤٩
	C-6	٣	١٢٢ - ١٢٨ +2A ٢٩ U→A	٢٤٨
	C-7	١	٢٣٠ - ٢٣٦ +U ٢٩ U→A	٢٤٩
	C-8	١	١٢٢ - ١٢٨ +A ٢٣٠ - ٢٣٦ +U	٢٤٧
	C-9	١	٣ U→A ٢٩ U→A ٤٣ A→U	٢٤٨
	C-10	١	١٢٢ - ١٢٨ +A ٢٠٨ G→A ٣ - ٤ UA→AU ٢٩ U→A ٧٠ G→U	٢٤٧

اكتشاف فيروس ضربة الشمس في الافوكادو في البلاستيدات الخضراء في الأوراق:

هل يكتيريا البناء الضوئي همزة وصل بين الفيروسات والنباتات؟؟

لقد صنف فيريد ضربة الشمس في الافوكادو في تحت مجموعة خاصة من الفيروسات وذلك لصفاته المميزة الفريدة عند مقارنته مع الفيروسات معروفة التابع. إن التابع الموجود في فيروس ASBVd يظهر تماثل منخفض بالنسبة للفيروسات المعروفة الأخرى، بالإضافة إلى أن الخيوط الموجبة والسالبة من RNA الفيرويدي عندها القابلة لأن تخضع لتفاعلات الانشطار الذاتي في المعمل خلال تركيب رأس المطرقة. إن عملية التحلل الذاتي والتي من المحتمل أيضاً أن تكون فعالة أو مؤثرة في ميكائزم التضاعف في الطبيعة لهذا الفيروس، فإنه يتشارك فيها أو يشترك معه فقط فيروس الموزايك الكامن في الخوخ (PLMVd) Peach Latent Mosaic Viroid وغير موجودة في أى من الفيروسات النموذجية الأخرى مثل PSTVd وغيره. إن تجارب تفريق الجزيئات تحت الخلوية (أصفر من الخلية) قد أظهرت موقع PSTVd في الأنوية وخاصة في أجزاء النوية في أوراق الطماطم المصابة، هذه الملاحظة تأكدت بواسطة طريقة التهجين في الموقع Situ - hybridization والتحليل بواسطة Confocal laser scanning microscopy of the fluorescent signals للمواد المنتجة بواسطة PSTVd في الأنوية المعزولة. كذلك فإن فيروسات أخرى تشترك بتمائل تتابع عال مع PSTVd تظهر أيضاً في ترافق مع الأنوية، وفي بعض الحالات مع مكونات الغشاء، وعلى أية حال عندما درس إنتشار الفيروس ASBVd في الأجزاء تحت الخلوية (أقل من خلية) فوجد الفيروس بشكل أساسى مترافقاً مع البلاستيدات الخضراء و / أو الشبكة الاندوبلازمية أو مع السيتوبلازم هذا يدل على أن ASBVd يبدو أيضاً أنه فريد في هذه الناحية وهذه إضافة جديدة لصفاته الفريدة.

إن تتابعات RNA في تخضيرات النسيج يمكن أن تتمركز في وضع معين عن طريق إختادات في التهجين في الموضع والميكروسكوب الالكتروني ونظراً لأن هذه الطريقة أقل عرضة أو ميلاً للتكاثر الصناعى منها في إجراءات التفريق فلقد

استعملت لغاية ١٩٩٤ فى حالة الفيرويدات. ولقد كانت هناك دراسة لاستكشاف كفاءتها عن طريق إعادة الإختبار لمعرفة تركز ASBVd فى الأجزاء تحت الخلوية.

طريقة الكشف عن مكان تواجد الفيرويد:

أخذت أجزاء ورقة من نبات افوكادو *Persea americana* سليمة وأخرى مصابة ولكنها غير مظهرة للأعراض بفيرويد ASBVd العزلة الأسبانية وثبتت فى مثبت Karnovsky المحور والذي يتكون من- 2% Paraformal- 2% glutaraldehyde in 50 mM cacodylate buffer pH 7.2, with 5mM CaCl₂ وأجرى لها عملية dehydrated خلال سلسلة إيثانول على درجة (- ٢٠م) وغمرت فى LRGold على درجة حرارة (- ٢٠م) تحت الأشعة فوق البنفسجية. حملت مقاطع ذهبية اللون على شبكات نكل ١٥٠ ميش (mech) مغطاة بغطاء Formvar. أجرى التهجين كما فى طريقة McFadden G.1 سنة ١٩٩٠ باستعمال منقّب RNA معلم بمادة داى جوز جنتين وموجه ضد الخيط الموجب من RNA (وهو الفيرويد المعدى والمسيطر من RNA الفيريدي) تحت ظروف شديدة (٦٠م، ٥٠٪ فورماميد Formamide) لمدة ٣ ساعات. صنع المنقّب عن طريق النسخ فى المعمل لـ linearized plasmid محتوياً على وحدة كاملة الطول مفروزة فى ASBVd باستعمال RNA Polymerase T₇ و- 11 Digoxigenin UTP. تفحص الشبكات فى الميكروسكوب الالكترونى JEOL JEM 100C. كانت تجرى عملية تقدير المناطق المشغولة بواسطة عضيات الخلية على طابعات بتكبير ٥٠٠٠ باستعمال Area Meter موديل LI - 3100 (LI - COR) وهذا النموذج معروف فى أمريكا.

فى التهجين فى الموضوع كان التقدير يتم عن طريق عد الأجزاء الذهبية الغروية التى كانت ملاحظة باستمرار فى البلاستيدات الخضراء، بعد عد هذه الأجزاء الصغيرة تبين أن معظم البلاستيدات الخضراء فى النسيج المصاب بالفيرويد ASBVd تحتوى بمعدل ١٢ حبيبة والتى تمثل ٧٠ - ٨٠٪ من عدد الحبيبات الكلى جدول ٥٧.

بقية الجبيبات تظهر فى السيتوبلازم والفجوة. أما بقية مكونات الخلية الأخرى مثل الميتوكوندريا، الأنوية وجدر الخلية كانت لا تحتوى شئ يذكر. نفس الشئ لوحظ فى العدد المطلق للجبيبات فى العضية الواحدة، ذكرت أيضاً عندما كانت كثافة الجببية لكل وحدة مساحة فى كل عضية محصورة. عندما قورنت هذه القياسات بين نباتات الكنترول والنباتات المصابة كان هناك زيادة معنوية أكثر من عشرة أضعاف يمكن أن تكشف فى البلاستيدات الخضراء الملونة والسيتوبلازم من الخلايا المصابة بالفيروس ASBVd. فى تجارب إضافية أخرى على الكنترول نفسه باستعمال نسيج مصاب بالفيروس ASBVd ومنقب موجه ضد الخط الموجب لفيروس اكسوكورتر الحمضيات (هذا الفيروس يختلف كثيراً فى تنابعه عن فيروس ASBVd) فإن معدل حيوية واحدة لكل عضية قد لوحظت فى العدد (باستثناء الميتوكوندريا) وهكذا كانت القيمة أقل بعشرة أضعاف فى CBVd.

إن اكتشاف الفيروس ASBVd فى البلاستيدات الخضراء chloroplasts عن طريق التهجين فى الموضوع أكد جزئياً مناقشات سابقة عن تمركز ASBVd فى البلاستيدات الخضراء أو الشبكة الاندولازمية مبنياً على معلومات محددة حصل عليها عن طريق التفريق بألة الطرد عن المركز وهذا ما ذكره Mohamed & Thomas سنة ١٩٨٠، ومن ناحية ثانية فإن دراسات متقنة عن أجزاء الخلية التى تهاجم بالفيروس ASBVd ذكرت أن الفيروس موجود فى السيتوبلازم وكميات أخرى توجد فى البلاستيدات الخضراء وهذا ما ذكره Marcos J.F. سنة ١٩٩٠.

نستطيع أن نقرر الآن بأن قليل جداً من الفيروس ASBVd يمكن أن يوجد فى السيتوبلازم، إلا أن معظم الفيروس يكون مترافقاً مع البلاستيدات الخضراء. إن تمركز الفيروس ASBVd فى البلاستيدات الخضراء آثار استفسارات هامة وكثيرة وننتظر من الأبحاث المستقبلية الإجابة عليها.

إن مركز تجمع الفيروس ASBVd يختلف عن المركز تجمع فيروس PSTVd وبعض الفيروسات المماثلة هذا يدل على تفاعلات متميزة بين خلية العائل

والفيروس في هذين المقيمين. ومن المهم أن نعرف أنه إذا كان فيروس PLMVd وهو الفيروس الوحيد الآخر المعروف والذي يشارك فيروس ASBVd في عملية التحليل الذاتي لسلاسل RNA، هل هو أيضاً يتركز في البلاستيدات الخضراء؟؟ فإذا كانت الإجابة نعم فيكون هناك مجموعة جديدة من الفيروسات لها صفات معينة ولها مجال جديد في التمرکز، إلا أنه لسوء الحظ فإن هذا الفيروس الجديد يتواجد بمستويات منخفضة جداً تجعل هذه الدراسة صعبة، إلا أن العلم ليس عليه حاجة صعبة فالمستقبل القريب سيجد حلاً لهذه المشكلة ونعرف الكثير عن الشقيق الجديد PLMVd.

ومن ناحية أخرى (سبق أن ذكرنا ذلك) فإن تناسخ الفيروس ASBVd قد تبين بأنه غير حساس للمستويات العالية من α - amanitin هذا يؤدي إلى القول بأنه إما أن أنزيم النواة والذي يسمى RNA - Polymerase like 1 أو لنشاط أنزيم RNA Polymerase - غير معروف أيضاً مقاوم لمادة α - amanitin تعمل على قالب RNA وتلعب دوراً في تناسخ ASBVd. وبالتالي يمكن القول بأن تناسخ ASBVd يمكن أن يساعد Catalyzed by بواسطة الأنزيم المسمى RNA Polymerase like 1 في الأنوية مع الفيروس ثم ينتقل إلى البلاستيدات الخضراء، أو يكون هناك بديلاً يمكن أن يتناسخ فيه وهو البلاستيدات الخضراء نظراً لأن نشاط أنزيم RNA - Polymerase لهذه العضية يكون غير حساساً لمادة α - amanitin.

أخيراً فإنه من المؤكد أن ASBVd وبعض الفيروسات الأخرى تتكاثر أيضاً في البلاستيدات الخضراء، هذا يؤدي إلى القول باحتمالية أن يكتيريا البناء الضوئي يمكن أن تكون واحدة من الحلقات بين الأجداد العليا للفيروس والنباتات وإشارات على احتمالية وجود RNAs شبيهة بالفيروسات في بدائيات النواة والنباتات الأولية.

هذه الفقرة الأخيرة تكون جواباً للسؤال الذي كان موضوع عنواناً لهذا البحث.

جنول ٥٧: تقدير الشكل القياسي للمناطق المشغولة بواسطة الضيقات الخلوية المختلفة وتناقص الانعكاس للصبغ immunogold بعد التجهين في العروص باستخدام منقذ DNA معوجه ضد الخط الموجه من ASBVd في أنسجة ورقة أفوكادو مصابة بالفيريود وأخرى سليمة.

الجزء المتغير في الورقة	الضيقات المعبدة في		متوسط مساحة المنطقة Um^2				أجزاء الذهب المعبدة	
	أوراق سليمة		سليمة		سليمة		كل عضية	
	أوراق سليمة	أوراق مصابة	سليمة	سليمة	سليمة	سليمة	كل Um^2	كل عضية
بلاستيدات خضراء	٢٩	٧١	١٤٢,٨	٧,٦	٢٥٤	١٧,٧	٤٠	٨٣٣
ميتوكوندريا	١٠	٢٧	٨٦٤,٩	٤٦	٣٥,٧	٢٥,٤	٩	٧١
ميتوكوندريا	٣٠	٨١	٨,٦	٠,٥	٩,٨	٠,٧	٣	٤
فجوة	١٠	٢٠	٨١٨,٥	٤٣,٦	٧٣٧,٣	٥٠,٦	٢١	٢٥
نواة	٦	٢٣	٤٣,٤	٢,٣	٨١,٢	٥,٦	٧	٩

ملاحظة:

حلت ١٠ خلايا سليمة من خلايا ميزوفيل الأفوكادو ٣٧ خلية ميزوفيل مصابة بالفيريود.

ملخص أبحاث العالم Semancik عن فيرويد ضريبة الشمس في الأفوكادو:

إن الميكانيكية التي بواسطتها ينزل الفيريود أو يتوزع بدون إنتظام ضمن أنسجة العائل من الأشجار الخشبية هي غير مفهومة جيداً، فمثلاً مخلوطات فيرويدات الحمضيات والذي يبقى فيها الفيريود ثابتاً لعدة سنوات في البرتقال الحلوة *Citrus si-nensis* أو السترون *C. medica* غالباً ما تنزل إلى عدة نماذج في الكريب فروت *C. paradisi* والمندرين *C. reticulata*. إن نقص الفيريودات المتخصصة من المخلوط يحدث عادة مع مخلوط من فيرويدات غير متقاربة. إن معيار الفيريود وشدة الأعراض لا يبدو أنها عوامل كمفاتيح في نقص المكونات من المخلوط.

إن التوزيع المتناقض الذى يظهر أثناء الكشف عن الفيريود ASBVd يؤدي إلى فحص جميع أجزاء النبات وتحديد أماكن توزيع هذا الفيريود. هذا الفيريود الذى يستطيع أن يتجمع إلى معيار عال جداً وجاهز للكشف، فى كثير من الحالات من المستحيل كشفه فى الأنسجة غير المظهرة للأعراض من الأشجار التى سبق إختبارها بنتيجة إيجابية لمرض ضربة الشمس. هذا يؤدي إلى القول بالتوزيع غير المنتظم للفيريود فى أنسجة العائل أو التجمع المتمركز لتنوعات مميزة للفيريود. إن الخفض أو المنع أو إبعاد الفيريود من الأجزاء غير المظهرة للأعراض فى الورقة التى هى مظهرة أعراض قد ذكر فى كثير من الأبحاث.

إن إختلافات حجم الجزئ بين التنوعات قد أستدل عليه بواسطة استعمال التحليل بـ PAGE تحت ظروف غير مدترة وارتبطت مع وجود أو غياب الأعراض، هذه الفرضية سنة ١٩٨٤ لا تؤيد بالأبحاث الحديثة سنة ١٩٩٤. إن إختلاف حجم الجزئ فى التنوعات يمكن اكتشافه فى الأجزاء المظهرة أعراض والتي تبين أعراض إما إبيضاض أو تبرقش. لا يوجد حجم غير متماثل قد اكتشف بواسطة sPAGE بين تنوعات ASBVd من مستخلص أنسجة حاملة بدون أعراض (Sc) أو ذات أعراض تبرقش (V).

عندما تعرف إنعزالات فيرويد عن طريق ظهور أعراض معينة يحدث زيادة كبيرة فى اكتشاف تتابع تنوع معين. من هذا أصبح من الممكن إختيار أنسجة بالمنظر والتي تحتوى تنوعات تتابع مميزة من تجمعات بتنوعات مثل ASBVd - B و ASBVd - V و ASBVd - Sc.

ولدعم الدليل على حدوث إنعزالات لتجمعات فيرويد محددة ضمن أنسجة يمكن أخذها من الحركة المخلدة بشكل كبير لـ ASBVd - B من المناطق المظهرة للأعراض إلى المناطق غير المظهرة للأعراض فى أوراق مفردة مظهرة أعراض الإبيضاض. نظراً لأن الإبيضاض هو عرض المجموع الخضرى الأولى لمرض ضربة الشمس، فإن الدور الأولى فى الإنتقال نستطيع أن نستنتجه بأنه سيظهر

BS - ASBVd وبالتالي فإن الحويمة النوعية Specific infectivity المنخفضة لتحضيرات من مسبب مرض ضربة الشمس في الأفوكادو يمكن أن توضح بواسطة المعيار المنخفض من BS - ASBVd. إن تنوع BS - ASBVd يمكن أن يكتشف حتى في الزيادة الضخمة من BS - ASBVd - V و BS - ASBVd - Sc وهذا يتميز بظهور الإصابة متأخرة.

إن تجمعات التنوعين السائدين من ASBVd وهما تنوع V و Sc غير مقيدة في أنسجة العائل. وعلى أية حال فإن هذه الأشكال من ASBVd ليست شائعة خلال الأطوار الأولى من الإصابة بضربة الشمس، إنها تظهر كأشكال ثانوية والتي تميل إلى التجمع باستمرار الإصابة.

إن المواقع السائدة في التتابع غير المتماثل في ASBVd هي العروات الطرفية، وإن اختلافات النيوكليوتيدات التي توجد في ثلاثة تنوعات تعكس هذا. وعلى أية حال فإن هذا غير مشابه لأكثر التتابعات حفظاً في نطاقى T₁ و T₂ من الفيروسات الأخرى.

إن النتيجة الإيجابية التي حصل عليها Rakowski & Symons سنة ١٩٨٩ في أبحاثهما على مرض ضربة الشمس في الأفوكادو، وقياسها على أبحاثنا نجد أن تنوع A - 1 الذى ذكره الباحثان يمثل في أبحاثنا في SB - 1 وهو التنوع الأصلي للفيروس. وكذلك فنحن قد وجدنا أن BS - ASBVd - Sc في تنوع نيوكليوتيدات كلوناته مشابه لما هو في SB1 - ASBVd. عندئذ يمكن القول أن تنوع A - 1 يمثل تنوع Sc ويمثل تنوع الفيروس الأصلي SB1 - ASBVd. إن المعيار العال من عزلة فيروس ضربة الشمس BS - ASBVd واسع الانتشار خلال أنسجة الأفوكادو (وهذا يؤكد الاستنتاج الذى ذكرناه سابقاً) من المحتمل أن يكون مساهماً للعزلة الأصلية SB - 1.

أما التنوع A - 2 فهو أكبر من A - 1 بنيوكليوتيدة واحدة ويوجد في أربعة كلونات cDNA وهو متطابق مع BS - ASBVd - V تنوع كلون ١٤ في أبحاثنا. جميع

التنوعات الكبيرة بين ٢٤٩ و ٢٥١ نيوكليتيده المذكورة من قبل العالمين السابقين تمثل بواحد أو إثنين من كلونات cDNA، هذه الكلونات كانت موجودة بتكرار منخفض وهي مشابهة لـ ASBVd - B.

إن التغيرات والإضافات في اليد اليمنى من عروة ASBVd - V يجعلنا نتنبأ بأنها ستؤدي إلى جعل المنطقة الطرفية أوسع أو مفتوحة أكثر. إن التوسع المقترح في تكرار A في العروة اليمنى من ASBVd - B ادخلت تحور استثنائي في التركيب مع ضمانات للدور الأولي المقترح لهذا التنوع في بدايات مرض ضربة الشمس. لقد اقترح Godman et al سنة ١٩٨٤ أن تناسخ الفيرويد يمكن أن يبدأ عن طريق ربط أنزيم RNA - polymerase II المعتمد على DNA في العروة الطرفية من جزئ الفيرويد وأن هذا التفسير التركيبي يمكن أن يعمل كموقع ربط متخصص.

إن تقدم الأعراض وإنتاج الفيرويد من البدايات لتكشف إصابة ضربة الشمس تظهر مميزات كل من الإصابات الحادة والدائمة. إن الطور الأولي لمرض ضربة الشمس يتميز عن طريق الكشف لتنوع ASBVd - B في تفاعل ذاتي محدد وهذا يكون مشير لشكل إصابة حادة. التعبيرات المرضية تبدأ عن طريق ASBVd - B ثم تتكشف بعد ذلك إلى إصابة دائمة كامنة مع إصابة دورية ولكن يحدث تغييرات غير متكررة تقطعها إما أعراض الإبيضاض أو التبرقش.

وأخيراً فإن مرض ضربة الشمس يكون أفضل وصف له بأنه إصابة مزمنة مع إنتاج معيار عال ومستمر ويمكن تقديره من ASBVd - Sc خلال العائل. إن هذه العلاقة الأخيرة الوطيدة بين العائل والكائن الممرض من الصعب جداً إدراكها بوضوح نظراً لأنها غير متبوعة بأية أعراض. هذا الطور يتميز بخفض كبير في إنتاج الشمار وزيادة كبيرة منسجمة في النقل بالبذرة في بعض الزراعات.

إن المعيار العال من ASBVd - Sc المكتشف فى الأنسجة غير المظهرة للأعراض يدل على تحول فى مسبب مرض ضربة الشمس إلى الشكل الذى يكون فيه مثل non - antagonistic RNA والذى يتواجه مع الأحماض النووية المنظمة فى العائل . برغم ذلك ونظراً لأن المستخلصات من هذه الأنسجة عندها المقدرة على إحداث الشكل الحاد أو المبيض من الإصابة إلا أن ASBVd - B يجب أن تتواجد ولو على أقل مستوى مطلوب وضرورى لإحداث إصابة حتى فى وجود معيار عال جداً من ASBVd - Sc . وبالعكس فإن بعض الأبحاث تفترض وجود ASBVd - Sc فى تجمع حتى يحدث فيه توسيع العروة الطرفية اليمنى فى الجزئ لى تحدث إعادة تنشيط للعزلة ASBVd - B ويزداد عددها وتحدث إصابة وهكذا .

بهذا التقرير الذى قدمه العالم Semancik سنة ١٩٩٤ يظهر واضحاً الاسهاب فى شرح فيروس ضربة الشمس فى الافوكادو، وذكر كل شئ معروف عنه تقريباً .

٢ - فيروسات الخوخ

Peach Viroids

١ - مرض الموزايك الكامن فى الخوخ

مقدمة:

ذكر هذا المرض فى الولايات المتحدة الأمريكية فى أوائل الخمسينات وكان يسمى موزايك الخوخ Peach mosaic وكان يعزى إلى مسبب فيروسى، إلا أن طرق إنتقال الكائن المسبب لم تكن واضحة واستمرت الأبحاث عليه حتى إتضح جيداً أن المرض لا يتسبب عن فيروس.

كان أول ذكر لهذا المرض فى فرنسا سنة ١٩٧٦ بواسطة العالم Desvignes وذكر أن هذا المرض منتشر بشكل كبير جداً فى فرنسا وبهاجم معظم أصناف الخوخ المزروعة. ذكر أيضاً فى اليابان فى نهاية السبعينات وكان يسمى قبل ذلك باسم الموزايك الأصفر فى الخوخ Peach Yellow mosaic.

ينتشر هذا المرض فى فرنسا بشكل كبير جداً، فقد وجد أن ٢٠٪ من زراعات الخوخ القادمة من أمريكا مصابة بهذا المرض وأن ٤٠٪ من الزراعات القادمة من اليابان مصابة بالمرض نفسه. أما فى الأصناف الأمريكية فينتشر المرض بنسبة ٨٨٪ وتصل النسبة فى الأصناف الأسبانية ٩٤٪. يبدو أن هذا المرض عالمى الإنتشار. لقد ذكر أن حوالى ٤٠٠ صنف من الخوخ فى مركز الأبحاث فى فرنسا أنها حاملة للمرض. لقد وجد أن هذا المرض متخصص على الخوخ ولم يمكن نقله أو اكتشافه فى النباتات الخشبية أو الشجيرة.

استطاع العالم Desvignes et al ورققاء أن يثبتوا بأن هذا المرض يتسبب عن فيرويد وليس عن فيرس.

الأعراض:

إن مرض الموزايك الكامن في الفوخ هو بشكل عام كامن في أشجار الفوخ *Prunus persica*. تظهر أعراضه على شكل موزايك على قليل من الأوراق فقط. أولى علامات المرض تصبح واضحة على أشجار الفوخ ذات عمر سنتين، يصعب اكتشاف الأعراض قبل هذا العمر. تشمل هذه الأعراض تأخير في التوريق (إظهار الأوراق) والأزهار والنضج. مدة التأخير هذه تختلف من أسبوع إلى أسبوعين ولكن في معظم الحالات لا يقل التأخير عن أسبوع. ثانی علامات المرض هو ظهور خطوط متقطعة أرجوانية على بتلات الأزهار ذات اللون الأبيض الوردی وتكون هذه العلامة واضحة في الجو الدافئ. أما الثمار زيادة عن كونها تتأخر في النضج يصبح سطحها خشن وذات شكل غير منتظم مسطحة قليلاً ذات لون غير طبيعي يميل إلى الأبيض مع وجود شقوق على خط التحام نصفی الثمرة. يظهر بقع على سطح الثمرة تختلف عن لون جلد الثمرة. تكون الثمرة سهلة الفتح أو تكون مفتوحة قليلاً إلا أن هذا المرض الأخير نادر الحدوث.

تبدو الأشجار وكأنها متقدمة في السن أكثر من سنّها الطبيعي بعدة مرات بعد أن تتخطى خمسة سنوات. يظهر نكروز في البراعم وتكون الشجرة أكثر حساسية لأضرار الصقيع وأمراض التقرح. يحدث المرض خسائر اقتصادية كبيرة جداً في بعض الحالات وتكون الأشجار بحالة يرثى لها (شكل ٨٣).

تسبب بعض عزلات الفيرويد موزايك على شكل لطع كبيرة وظهور تنقيط ونكروز في الأوراق، هناك عزلات أخرى تسبب تنقر الساق والتفاف الأوراق. تتقرم السيقان وتكون غليظة ومنتفخة، تتجمع الأوراق في قمم الفروع على شكل خصللات وتبدو الشجرة ذات نموات حديثة قصيرة وقليلة جداً وتكون كمية

الإثمار منخفضة جداً. الأوراق تكون رفيعة وضيقة بها بقع صفراء وخضراء (شكل ٨٤).

إن هذا المرض اسمه Peach latent mosaic Disease مرض الموزايك الكامن في الخوخ. من هنا ينشأ إستفهام، إذا كان هذا المرض كامن فلماذا تظهر كل هذه الأعراض؟؟. للإجابة على هذا السؤال نقول إن كلمة الكامن (Latent) في الاسم ادخلت وصفاً للمرض منذ أول ملاحظة له في فرنسا، حيث لم تلاحظ الأعراض على الأوراق في البداية. وكذلك يقصد بها أن معظم الأعراض سواء الناجمة طبيعياً أو بالعدوى الصناعية لا تظهر على الأوراق في البداية وذلك لأن أهم علامات المرض التي ذكرناها سابقاً هي تأخير التوريق والإزهار والنضج وتشوه الثمرة وتشقق الخط الواصل بين نصفي الثمرة وهكذا كما ذكرنا سابقاً وأن الأعراض لا تكون واضحة على الأوراق قبل ٢ - ٣ سنوات، وبالتالي استعملت كلمة الكامن Latent والمقصود بها على الأوراق. ثم بعد أن عرفت جميع أعراض المرض في مراحل نمو النبات المختلفة ومنها الأوراق لم تحذف الكلمة واستمر استعمالها ولكن بدون مدلول منطقي.

هناك دراسات أجريت في إيطاليا استمرت لعدة سنوات على ثمار خوخ مصابة بمرض معين في مناطق البساتين المختلفة وخاصة في مقاطعة Ravenna. أعراض هذا المرض تكون على شكل دوائر صغيرة واضحة على جلد الثمرة ذات لون أصفر مخضر خفيف. هذه الأعراض تخفص من القيمة التسويقية للثمار. المرض هذا ينتشر في كثير من المناطق المحددة ومعروف فيها.

إن التحليل بطريقة PAGE لمستخلصات الأحماض النووية للثمار والأوراق أظهرت وجود جزيئات RNA دائرية ذات وزن جزيئي منخفض ولكن لم يحدد (لغاية ١٩٩٢). وكذلك لم يحدد هذا المرض هل هو من عزلة جديدة لهذا الفيرويد أم أنه فيرويد منفصل.

المسبب :

يتسبب مرض الموزايك الكامن فى الخوخ عن فيروس Peach Latent Mosaic Viroid ويكتب PLMVd. لقد درس تتابع هذا الفيروس فوجد أنه يتكون من جزئ RNA دائرى به ٣٣٧ نيوكليتيده والتي تأخذ الشكل المتفرع عندما تنفرد فى نموذج أقل طاقة حرارية حرة. يظهر فى هذا الفيروس (PLMVd) تماثل محدود بالنسبة للفيروسات الأخرى وكذلك بالنسبة للفيروسات، ولكنه لا يحوى أى من صفات التابع المركزى المحفوظ لأى من تحت المجموعات النموزجية للفيروسات. وعلى أية حال فإن تتابع جزء من الفيروس حوالى الثلث تقريباً به عناصر مطلوبة لتتشكل فى ال RNAs من كلا القطبين لتركيبات رأس المطرقة وهذه التركيبات هى التى تقوم بعملية الإنشطار الذاتى كما فى فيروس ضربة الشمس فى الأفوكادو ASBVd وفى بعض الفيروسات. إن الخيط الموجب والسالب من RNA الجزئى وكامل الطول من نسخ PLMVd تحوى تركيبات رأس المطرقة وتظهر الإنشطار الذاتى خلال النسخ وبعد التنقية كما هو متوقع من هذه التركيبات.

إن الدراسات الكاملة على هذا الفيروس أثبتت أن فيروس PLMVd يجب أن يضم إلى تحت مجموعة فيروسات يمثلها ASBVd والتي تتميز أفرادها بمقدرتها على الإنشطار الذاتى فى المعمل وأحياناً فى الطبيعة خلال تركيبات رأس المطرقة. وبالنظر إلى شجرة النشوء فى الفيروسات (هذه الشجرة موجودة فى مراجع تصنيفات الفيروسات) فلقد إقترح فيها أن PLMVd والفيروس ASBVd يمكن أن تمثل حلقة تطور ونشوء بين الفيروسات والفيروسات.

يمكن أن ينقى فيروس PLMVd بعد خطوتين من ال PAGE ويمكن أن يتحصل على ١ - ٢ ميكروغرام من الفيروس من كل كيلوغرام ورق خوخ طازج.

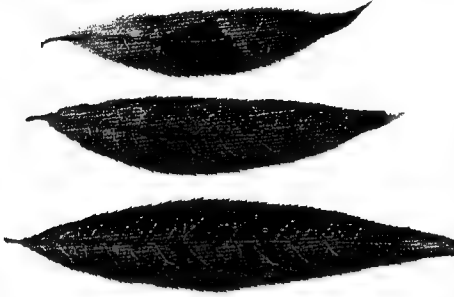
كذلك يمكن الحصول على الفيرويد ثانية من الثمار الحديثة المجموعة فى نهاية طور الأزهار، ولكن الكمية المتحصل عليها من هذه الثمار تكون أقل منها فى الأوراق. الفيرويد لا يهاجم أى من *Cucumis sativus*، *Gynura aurantiaca*، *L. esculentum* و *C. morifolium*.

لا يوجد تماثل تتابع مشترك بين فيرويد PLMVd وفيرويد CEVd العضو الممثل لتحت مجموعة فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس PSTVd ولا مع ASBVd العضو الممثل لمجموعة A فى الفيرويدات. ومن ناحية أخرى مع أن PLMVd يختلف كلية فى تتابعه عن ASSVd، إلا أن الفيرويديين يبدو أنهما يشتركان فى قليل من تماثل التتابع. كذلك هناك تماثل تتابع محدود موجود بين PLMVd والفيرويد HSVd.



شكل رقم ٨٣ :

أعراض الإصابة بفيرويد PLMVd على أشجار الخوخ ذات عمر سبعة سنوات.



شكل رقم ٨٤ :

أعراض إصابة أوراق الخوخ صنف GF - 305 بالسلالة الشديدة من فيروس PLMVd والتي هي 168 - D.

تتابع النيوكليوتيدات فى فيروس PLMVd :

باستعمال تداخلين Overlapping وطول كامل من كلونات cDNA من الفيروس PLMVd إحداهما يحصل عليه بواسطة برايمر Primer (26 - mer) على المواقع بين ١٩٣ و ٢١٨ والثانية حصل عليها بواسطة برايمر ٢ (34 - mer) بين المواقع ٩١ - ١٢٤، إختبرت ودرست مواقعها فى الاتجاهين. إن كلونات cDNA الثانوية جعلت من الممكن تصحيح التتابع المتطابق بنهاية 5 للبرايمر الأول. إن شكل ٨٥ يظهر التركيب الأولى للفيروس PLMVd والذي هو RNA دائرى يتكون من ٣٣٧ نيوكليوتيدة تتألف من ٩٠ G بنسبة ٢٦,٧٪ و ٨٧ C بنسبة ٢٥,٨٪ و ٨٠ A بنسبة ٢٣,٧٪ و ٨٠ U بنسبة ٢٣,٧٪. وبالتالي فإن الفيروس يحتوى من G + C نسبة ٥٢,٥٪ وهى أقل من تلك الموجودة فى الفيروسات الأخرى حيث تصل ٥٦ - ٦٠٪ باستثناء فيروس ASBVd حيث تصل فيه ٣٨٪.

عند مقارنة تتابع الفيرويد PLMVd مع الفيروسيدات النمذجية ومع بعض الفيروسيدات وجد أنه مع أن هذا الفيرويد يشارك تماثلات تتابع مع جميع الفيروسيدات النمذجية والفيروسيدات، إلا أن هذه التماثلات تكون محدودة ولا تشمل التتابع عال الحفظ الذى يميز المنطقة المركزية لأفراد تحت مجموعة B₁. وعلى أية حال فإن الخيط السالب والموجب من RNAs للفيرويد PLMVd لا تمتلك التتابع المحفوظ من تركيب رأس المطرقة الذى يحدث فيه الإنشطار الذاتى من RNAs فى الفيرويد ASBVd وفى بعض RNA للفيروسيدات.

التركيب الثانوى المقترح للفيرويد PLMVd :

فى البحوث التى أجريت على التركيب الثانوى للفيرويد PLMVd بأقل طاقة حرة of lowest free energy أدت إلى ظهور تركيب غير متوقع له نقطتى نزع والذى يخرج منها ٣ - ٥ أذرع، بينما مواصفات التركيب شبه العصى وجدت فى جميع الفيروسيدات النمذجية باستثناء الفيرويد الكامن فى حشيشة الدينار hop latent Viroid والذى له تركيب ذو شعبتين أكثر ثباتاً إلى حد ما من الشكل شبه العصى الذى من المفروض الحصول عليه. إن تطبيق نفس الوضع على حالة ASBVd أدى أيضاً إلى تكوين شكل شبه عصى ولكن بشعبة قصيرة على واحدة من نهاياته وهذا يتفق مع النتائج السابقة.

فى التركيب الثانوى المقترح للفيرويد PLMVd فإن تزاوج نيوكليوتيداته تمثل ٧١,٢٪ من المجموع حيث شملت G + C ٥٢,٥٪ و A + U ٤٠,٨٪ و G + U ٦,٦٪.

تركيب رأس المطرقة للفيرويد PLMVd :

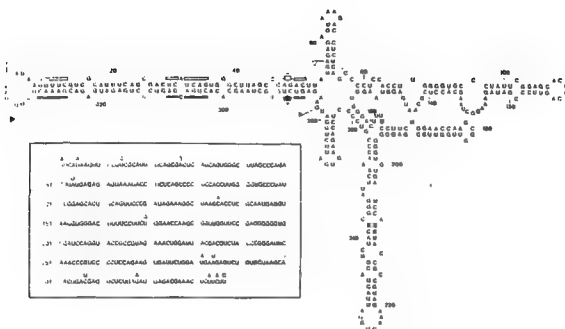
يظهر فى شكل ٨٦ أنه فى PLMVd RNA أن الأقطاب الموجبة والسالبة فيها .

١٣ مركز محفوظ معاً مع عناصر أخرى تميز تركيبات رأس المطرقة المستول عن تفاعل الإنشطار الذاتي في المعمل في الفيرويد ASBVd. إن كلا تركيبى رأس المطرقة للفيرويد PLMVd يكون داخلياً فى قطعة تمثل تقريباً ثلث تتابع الفيرويد ولها سيقان ثابتة جداً رقم III فى شكل ٨٦ ذراع قصير يتحلق خارجياً فى نهاية ساق I و II مشابهاً فى هاتين الحالتين تركيبات رأس المطرقة فى الفيرومايدات والمرافقات الفيرويدية أكثر من تشابهها مع الفيرويد ASBVd.

ومن المهم أن نذكر هنا أن استبدال القواعد الموجودة فى الكلونة الثانوية للفيرويد PLMVd فى منطقة تركيب رأس المطرقة إما أن لا يؤثر على ثبات ساق II و III أو أنه يتمركز فى العروات. إن التركيب السالب والموجب لرأس المطرقة يشارك كثيراً فى تماثل التتابع.

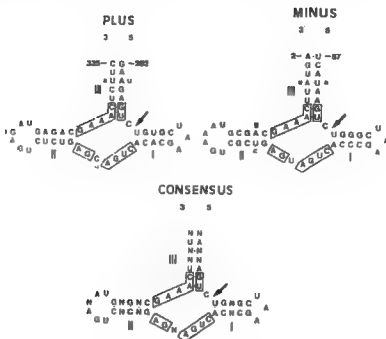
موقع الفيرويد PLMVd بين الفيرويدات والفيرومايدات:

إن شجرة نشوء وارتقاء الفيرويدات تنسب الفيرويد PLMVd إلى أفراد تحت مجموعة الفيرويدات النموزجية حيث أنه ينسب إلى مجموعة ASBVd. ويمكن القول باختصار أن الأصل المشترك المفترض لنشوء الفيرويدات والفيرومايدات يمتد ليشمل PLMVd بالإضافة إلى فيرويد 1 Coleus blumei Viroid ويبدو أن PLMVd بعيد عن الفيرويدات النموزجية ويكون قريب جداً من ASBVd ويكون قريب بشكل خاص من الفيرومايد vLTSV حيث أن الحمض النووى فى ASBVd وفى vLTSV له تركيب رأس المطرقة فى كلا القطبين.



شكل رقم ٨٥:

التركيب الثانوي الناتج من استعمال الطاقة الحرة المنخفضة لفيريد PLMVd. نطاقات السالب الموجب للإنتشار الذاتي محددة بالإعلام. إن المراكز الثلاثة عشر المحفوظة موجودة في جميع تركيبات رأس المطرقة ويشار إليها بشروطات. مراكز الإنتشار الذاتي المتوقعة مشار إليها بأشهم. رؤوس الأشهم الصغيرة تشير إلى الاضطراب الموجبة والسالبة. إن التركيب الأولي للفيريد PLMVd باختلافات التابع الناتجة من استبدال القواعد مشار إليها فوق التابع. إن مواقع Pst I و Sma I موجودة بين المواقع ١٠٩ - ١١٤ و ٢٤١ - ٢٤٦ بالترتيب.



محل رقم ۸۶ :

تركيب رأس المطرقة من الموجب والسالب في PLMVd RNAs مع أسهم مشيرة إلى مواقع الإنتظار الذاتي. المواقع المحفوظة في حلق ببط سميكة هي التتابع المحفوظ في جميع تركيبات رأس المطرقة في مواقع متشابهة. الأحرف السفلية تدل على قواعد مستتبلة. N تسمى مواقع غير محفوظة. إن تركيب رأس المطرقة يجمع بين الأفراد السالبة والموجبة من PLMVd ويكون دائماً موجودة. إن زوج القواعد الطرفي في الساق III من تركيب رأس المطرقة من PLMVd RNA الموجب لا يوجد في التتابع المتأخر من كلون PLMVd الثاني حيث أن C تل على الموقع ٣٣٠ قد استبدل بـ A.

الصفات العامة للفيرويد:

١ - الصفة الأولى:

إن الصفة الجديرة بالذكر لفيرويد PLMVd هي مقلته على تشكيل تركيب رأس المطرقة والتي هي من مميزات الفيروسايدات ولكنها لغاية الآن معروفة في فيرويد واحد هو ASBVd. إن فيرويد PLMVd يستطيع مثل ASBVd أن يتولى القيام

بتركيب رأس المطرقة فى الأحماض النووية RNAs فى كلا القطبين، مع أنه بالنسبة للتركيبات المزدوجة لرأس المطرقة قد يفترض بأنها تعمل فى تفاعلات الإنشطار الذاتى (خاصة فى القطب الموجب) نظراً لأن تركيب رأس المطرقة المفرد فى الفيروس ASBVd غير ثابت. وعلى العكس من ذلك فإن تركيبات رأس المطرقة فى الفيروس PLMVd ثابتة وأن الأحماض النووية RNAs تحتوى فقط مجموعات من تتابع PLMVd ذات كفاءة قطبية فى الإنشطار الذاتى خلال النسخ، تدل على أن هناك تفاعلات متماثلة أكثر احتمالاً لأن تقع خلال ميكانيكية تركيب الجزيء. إن تركيبات رأس المطرقة للسالب والموجب فى PLMVd أكثر علاقة وقرباً من بعضها البعض أكثر منها فى أى من تركيبات رأس المطرقة المعروفة الأخرى، هذه الحالة قد لوحظت أيضاً بين تركيبات رأس المطرقة فى الفيروسات vLTSV. زيادة على ذلك فإن الثلاثة عشر مركزاً المحفوظة من السالب والموجب فى رؤوس المطرقة للفيروس PLMVd وتمثلها فى مواقع الإنشطار الذاتى (مفصلة بواسطة ٩٦ موقع نيوكليوتيدى) تحدث فى مواقع متعكسة فى التركيب المفترض فى الموجب والسالب من RNAs PLMVd وأيضاً تحدث فى vLTSV، كذلك فإن مواقع الإنشطار الذاتى فى vLTSV تكون مفصلة بستة نيوكليوتيدات فقط وإن جزء من نطاقات الإنشطار الذاتى تكون متداخلة. إن التركيبات من أقل طاقة حرة لأى من PLMVd RNA يحتوى تركيبات رأس المطرقة وبناء على ذلك تكون غير متوقعة الإنشطار الذاتى. هذه التكوينات تكون غالباً موجودة فى النسخ النقية الكاملة بالإضافة إلى الفيروس الدائرى المعدى. إختيارياً فإن التكوينات الفعالة يمكن أن تتشكل خلال النسخ وتحت الإنشطار الذاتى قبل أن يتم بناء RNA وأن معظم التركيبات غير الفعالة الثابتة يمكن أن تتشكل. ومن المهم أن نذكر هنا أن هناك تماثل بين مواقع النيوكليوتيدات المشكلة من ساق I و II من تركيبات رأس المطرقة فى PLMVd السالب والموجب، بشكل خاص من تلك التى هى قريبة من العروة مفردة الخيط الداخلية أو الأساسية والمواقع المماثلة من تركيبات رأس المطرقة فى PLMVd (الموجب) والموجب فى فيروسات البرسيم المنقط والموجب والسالب فى فيروسات vLTSV.

٢ - الصفة الثانية:

إن الصفة الثانية من صفات PLMVd الجديرة بالاهتمام هي نموذج التركيب الثانوى ذو الطاقة الحرة المنخفضة حيث يظهر فيه نقطتى تفرع، غير مشككة، بالتالى للتركيبات شبه العصبية التى تميز معظم الفيروسات النموذجية. إن التركيب المتفرع للفيروس PLMVd، يمتلك، مع ذلك، ثبات ضمن المدى لتلك التركيبات شبه العصبية للفيروسات النموذجية كما يستدل من القيم المتحصل عليها بالمقياس $\Delta G / N$. إن هذا النوع من التركيب المتفرع قد ذكر فى بعض الفيروسات والفيروسايدات، مع أنه فى حالة الفيروس PLMVd فإن عدد التفرعات يكون أكبر وهى أطول أيضاً. إن الأهمية الفسيولوجية لهذا التركيب المفترض غير معروفة (١٩٩٤) مع أن الجزء المحتوى التابع الداخلى فى تركيبات رأس المطرقة يكون ثابت جداً (هناك قطعة مشابهة ثابتة يمكن أن تتشكل فى القطب السالب) وكما قلنا سابقاً من الممكن أن يحفظ جزيئات الفيروس الدائرى من الإنشطار الدائرى.

٣ - الصفة الثالثة:

كما ذكرنا سابقاً فإن فيروس PLMVd يصيب الخوخ *Prunus persica* وإن أكثر السلالات شدة هي D - 168 وإن أكثر الأنواع حساسية للمرض هي شتلات النوع GF - 305. كذلك فإن هذا الفيروس PLMVd يشابه الفيروس ASBVd فى كونه لا يحتوى تتابع GAUUUU المحفوظة فى جميع الفيروسات فى موقع مشابه فى تركيبها الثانوى المفترض والذي يمكن أن يلعب دوراً فى تناسخ هذه الفيروسات.

٤ - الصفة الرابعة:

إن المدى العائلى المحدود جداً للفيروس PLMVd وهو المسبب لمرض الموزايك الكامن فى الخوخ *Prunus persica* فقط، هذا يذكرنا بالصفة المماثلة فى

فيروس *ASBVd* والذي يسبب ضربة الشمس في الافوكادو فقط *Persea americana* وبعض الأنواع من العائلة الغارية (*Lauraceae*) كذلك فإنهما يشتركان في إظهار بعض الأعراض المتشابهة. إن فيروس *PLMVd* لا يسبب ظهور الأعراض على الأوراق إلا بعد أن تصل الشجرة لعمر خمسة سنوات وبقيّة الأعراض تظهر مبكراً. كذلك فإن الأعراض المتكونة بسبب *ASBVd* على الأوراق لا تكون منتظمة أيضاً، وبعض الإصابات تكون كامنة أو بدون أعراض على الأوراق.

٥ - الصفة الخامسة:

إن التابع في الفيروس *PLMVd* فيه تماثل جزئي بالنسبة للفيروسات الأخرى بالإضافة إلى بعض الفيروسات ونتيجة لدراسة شجرة أصل ومنشأ الفيروسات (ذكرناها سابقاً) وجد بأن هناك علاقة بين الفيروس *PLMVd* والفيروس *vLTSV* أيضاً فإن طول تفرع الفيروس يكون حقيقة تدل على المنشأ الطويل المنفصل لهذا التابع وعلى الصفات الحيوية التي تثبت بأن هذا الفيروس فعلاً يتبع الفيروسات وليس الفيروسات، ولكنه يمثل حلقة وصل أو حلقة تطور واضحة جداً بين الفيروسات والفيروسات أكثر من دور الفيروس *ASBVd* في تمثيل حلقة الربط هذه.

٦ - الصفة السادسة:

إن فيروس *PLMVd* هو الفيروس الثاني من تحت مجموعة الفيروسات التي تتميز بأنها تمتلك تركيبات رأس المطرقة المسفول عن الإنشطار الذاتي في المعمل والذي من المحتمل أن يلعب أيضاً دوراً في تجهيز بوائى ال *Oligomeric* في الطبيعة. إن الفيروس *ASBVd* هو النموذج المثالي لتحت هذه المجموعة والتي أعطيت اسم *avsunviroid*.

٧ - الصفة السابعة:

ينتشر فيروس *PLMVd* في المزارع النامية فيها شجيرات الخوخ وينتشر في مساحات واسعة من هذه المزارع، إلا أنه لا يوجد دليل على الانتقال الميكانيكي في

الحقل عن طريق الأيدي أو الأدوات الزراعية الملوثة إلا أن هذا الرأي يحتاج إلى دراسات أوسع. لقد ثبت أن هذا الفيرويد ينتقل بواسطة حشرة المن *Myzus persicae* ولكن الظروف المحيطة بانتقال هذا الفيرويد بهذه الحشرة لا تزال قيد البحث.

٨ - النصف الثامنة:

يمكن اكتشاف الفيرويد PLMVd بأى من الطريقتين ١ - طريقة PAGE وهى أكثر سرعة ومتخصصة فى اكتشاف الفيرويد الدائرى ولكنها لا تعمل لإكثار لكمية الفيرويد الموجودة فى العينة، وبالتالى يمكن أن تفشل هذه الطريقة فى كشف الفيرويد فى المستخلص إذا كان كميته منخفضة (مثلاً فى حالات الإصابة الحديثة). ٢ - من ناحية أخرى فإن الإختبارات الحيوية مع أنها تتطلب وقت طويل إلا أنها أكثر حساسية وهى الطريقة الثانية فى الكشف عن الفيرويد. إن فهرسة بادرات الخوخ سلالة GF - 305 أظهرت أن الفيرويد PLMVd ينتشر جيداً فى جميع أعضاء النبات، الفروع الحديثة والأغصان القديمة والأوراق والجلود. كذلك فقد أمكن اكتشاف الفيرويد بطريقة PAGE فى مختلف أجزاء النبات المصابة بالفيرويد فى شجيرات GF - 305 منها الجذور، نصل الأوراق، العروق الرئيسية، القلف وخشب الساق. كذلك فإن طريقة PAGE تسمح بالكشف عن الفيرويد فى الثمار الحديثة والناضجة. لا يتواجد هذا الفيرويد فى البذور وبذلك فهو لغاية (١٩٩٤) لم يثبت أنه ينتقل بالبذور.

ب - عرض تنقر ثمار الخوخ والبوقوق

Dapple Fruit Disease of Plum and Peach

مقدمة:

لقد إكتشف مرض جديد على. البرقوق *Prunus salicina* فى اليابان وذلك بواسطة العالم Terai سنة ١٩٨٥. أعراض هذا المرض على شكل بقع كبيرة حمراء منتشرة على الثمار خاصة الصنف Taiyo عند النظر للثمار من على بعد

يلاحظ وكأنها منقرة نظراً لانعكاس الأشعة من البقع المختلف عن إنعكاسها من سطح الثمرة. ينتقل المرض عن طريق التطعيم وسمى مرض تنقر ثمار البرقوق Plum Dapple Fruit Disease. بعد ذلك تم اكتشاف مرض آخر يصيب البرقوق يتميز بظهور لون أحمر مصفر في لحم الثمرة صنف Soldam وينتشر بشكل واسع في اليابان وسمى مرض إصفرار ثمار سولدم Soldam Yellow Fruit Disease وهذا المرض وصفه أيضاً العالم Terai سنة ١٩٨٧. يبدو أن كلا المرضين يتسبب عن نفس الكائن الممرض. ونظراً لأن أشجار البرقوق السليمة صنف Taiyo التي حقنت بالتطعيم من صنف سولدم الذي عليه أعراض مرض إصفرار ثمار سولدم، تكشف على الثمار أعراض تنقر والعكس بالعكس. هذا يدل على أن هناك علاقة بين المسببين. هناك أعراض مماثلة تتكون من بقع كبيرة شاحبة على ثمار الخوخ *Prunus persica* على الصنف Asama - Hakutou في اليابان.

لقد اكتشف فيروس مسبب مرض تنقر الثمار على الصنف Taiyo فوجد أنه مشابه لفيروس تقزم حشيشة الدينار HSVd السلالة التي تصيب العنب وهو ذو تماثل تتابع عال نسبياً بالنسبة إلى مجموعة فيروس HSVd.

مسبب المرض:

لقد عزلت الفيروسات من أشجار البرقوق *Prunus salicina* المصابة بمرض تنقر ثمار البرقوق Plum dapple fruit disease ومن أشجار الخوخ *Prunus persica* المظهرة أيضاً أعراض تنقر الثمار. عند حقن الفيروسات ميكانيكياً في نباتات العائلة القرعية تظهر أعراض نموذجية للأعراض التي يسببها فيروس تقزم حشيشة الدينار HSVd في نباتات القرعيات. إن التركيب الكامل للتابع النيوكليتيدي في عزلة الفيروس من الخوخ ومن البرقوق تسمى عزلة AF كانت متماثلة وفيها ٢٩٧ نيوكليتيدي ذات تماثل تتابع ٩٣,٦٪ بالنسبة للفيروس HSVd عزلة حشيشة الدينار. هناك عزلة أخرى من الخوخ تسمى عزلة (A9) تكون من ٢٩٧ نيوكليتيدي ولكن تماثل التتابع فيها ٩٩,٧٪ بالنسبة للفيروس HSVd عزلة حشيشة الدينار، وإن فيها

نيوكليتيده واحدة تغير مكانها. هذه النتائج أدت إلى القول بأن هذه الثلاثة فيروسات هي سلالات من فيروس HSVd وتسمى HSVd - Plum، HSVd - plum AF و HSVd - Peach A9. إن الفرق الوحيد بين هذه العزلات وعزلة HSVd - hop (المعزولة من حشيشة الدينار) موجود في جزء اليد اليسرى من الجزيء متضمنة الجزء السفلى والمنطقة المركزية المحفوظة. ولقد تأكدت الأبحاث في اليابان بأن هذه العزلات هي المسببة لمرض تنقر الخوخ ومرض تنقر البرقوق.

الصفات العامة للعزلات المسببة للأمراض:

لقد تبين أن كلا الفيروسين المعزولين من البرقوق والخوخ هما قريباً العلاقة جداً مع فيروس HSVd على أساس أعراضهما المرضية على نباتات العائلة القرعية وعلى التحليل بواسطة PAGE وطريقة تهجين الجزيء. إن أعراض هذه الفيروسات على نبات الخيار صنف Suyo كانت نفسها دائماً تسبب. عن HSVd عزلة حشيشة الدينار. إن المدى العائلي لعزلة الفيروس المأخوذة من البرقوق ليشابه المدى العائلي للعزلة من حشيشة الدينار ولكن عزلة البرقوق لا تهاجم الطماطم، في حين أن عزلة حشيشة الدينار تصيب الطماطم بدون إحداث أعراض. إن عزلة الخوخ (A9) تختلف بنيوكليتيده واحدة عن عزلة حشيشة الدينار وتسمى فيروس حشيشة الدينار المعزول من الخوخ HSVd - peach أما التي من البرقوق تسمى فيروس حشيشة الدينار المعزول من البرقوق HSVd - plum.

بالاعتماد على نتائج تجارب الحقن بالعصارة والتحليل بواسطة PAGE يبدو أكثر احتمالاً بأن HSVd - plum تسبب مرض تنقر الثمار النموذجي في البرقوق صنف Taiyo، كذلك فإن العزلة نفسها تسبب تنقر الثمار على الخوخ. أما HSVd - peach (AF) أو عزلة (A9) HSVd - peach يبدو أنهما مترافقتان مع أعراض تنقر الثمار في الخوخ والبرقوق. إن هاتين العزلتين فيهما تتابع نيوكليتيديات مختلف. إن العزلة HSVd - peach (AF) المعزولة من الخوخ تظهر أعراض تنقر شديدة جداً على الخوخ ولكن HSVd - peach A9 المعزولة من الخوخ تظهر أعراض تنقر

بسيطة جداً على البرقوق. ولكن يجب أن نذكر هنا أن هناك احتمال حدوث خطأ في طرق عزل هذه العزلات أو أن هناك فيروس آخر لم تتمكن التجارب من اكتشافه له دور مهم في إظهار الأعراض (ومرافق أو غير مرافق للعزلات السابقة) موجود في أشجار الخوخ أو البرقوق. ونظراً لأن HSVd قد اكتشف على نباتات حشيشة الدينار في اليابان فإن هناك مجموعة من العوامل المرضية المشابهة لهذا الفيروس وتسمى مجموعة HSVd وهي منتشرة ومسببة أمراض في أنواع مختلفة من أشجار الفاكهة مثل العنب، الحمضيات، الخوخ والبرقوق. بعض هذه السلالات من HSVd تسبب أمراضاً خطيرة على حشيشة الدينار، الخيار، البرقوق وأحياناً الخوخ ولكنها تصيب العنب والحمضيات بدون إظهار أعراض (كامنة) ويمكن النظر إلى هذه النباتات أن لها دور مهم في إظهار وبائية HSVd وتعتبر مصدر كبير وكثيف لإنتشار الفيروس.

فيرويدات تحت الدراسة

أ - فيروس تقزم الدخان البري

Nicotiana glutinosa Stunt Viroid (NgSVd)

مقدمة :

يتعرض نبات الدخان البري *Nicotiana glutinosa* إلى الإصابة بفيروس تقزم الدخان البري NgSVd، وتتميز أعراض الإصابة به وتظهر على شكل تدلى الأوراق، التقزم، المظهر الشجري أو المنقودي للنباتات وأحياناً يظهر نكروز على أوراق النبات. بإجراء عملية التحليل بواسطة طريقة PAGE على مستخلصات النبات وجد أن هناك حمض نووي ذو وزن جزيئي منخفض له سرعة أكثر من سرعة فيروس تقزم قمة الطماطم الهندي TBTVd. لقد تأكد من هذه العملية (PAGE) أن مرض تقزم الدخان البري يتسبب عن هذا الفيروس. يختلف فيروس NgSVd عن فيروس تقزم قمة الطماطم الهندي في المدى العائلي الذي يصيبه حيث أن فيروس NgSVd يمكن أن ينتقل إلى:

1 - *Nicotiana clelandii*

2 - *N. debneyi*

3 - *N. plumbaginifolia*

4 - *Luffa acutangula*

5 - *Cucumis sativus*

6 - *Cajanus cajan*

7 - *Vigna unguiculata*

8 - *Chenopodium amaranticolor*

يفصل الحمض النووي RNA المعدي للفيرويد إلى حزمتين في الجيل تدل الأولى على الشكل المستقيم للفيرويد وتدل الثانية على الشكل الدائري. يبلغ الوزن الجزيئي للفيرويد $1,1 \times 10^6$ دالتون.

الأعراض:

أولى أعراض هذا المرض تدل الأوراق وهذا المظهر يحدث بعد ١٠ - ١٥ يوم من الحقن ويظهر على جميع النباتات المحقونة بالفيرويد. بعد ٢٠ - ٣٠ يوم يصبح ٨٠٪ من النباتات المحقونة متقزمة ذات مظهر شجيري أو عنقودي، هذا المظهر يتكون نتيجة لتثبيط نموات القمم وكثرة نموات الفروع الجانبية المتكونة من البراعم الإبطية. بعد ٢ - ٣ شهور من الحقن تظهر الأعراض الثانوية وتبدأ على شكل نكروز في العروق الرئيسية في الورقة ثم العروق الفرعية ثم تمتد إلى أسفل لتصل عتق الورقة ثم الساق. تفشل النباتات المصابة في الإزهار وإذا أعطت أزهار تكون هذه الأزهار عقيمة.

إن تعبيرات الأعراض المرضية المتسببة عن الفيرويد NgSVd وتركيز هذا الفيرويد كلاهما يعتمد على درجة الحرارة والضوء. أثناء شهور الصيف المشمس (ذات الكثافة الضوئية العالية) والفترات الضوئية الطويلة بمتوسط ٩,٦ ساعة يومياً، وذات درجات الحرارة العالية ٤٠ - ٤٥°م، فإن كلا من الأعراض الأولية والثانوية تظهر بسرعة أكثر حيث تحتاج الأعراض الأولية ١٦ - ٢٠ يوم أما الثانوية تحتاج ٥٠ - ٦٠ يوم وتكون الأعراض أكثر شدة في كلتا الحالتين. أما في فصول الشتاء ذات درجات الحرارة المنخفضة حوالي ٨ - ١٧°م وكثافة إضاءة منخفضة وإضاءة شمسية أقل من ٧,٨ ساعة، تظهر الأعراض الأولية معتدلة أو متوسطة وتحتاج ٢٠ - ٣٠ يوم حتى تظهر (بعد الحقن) ولا يتكشف نكروز على أى من النباتات المحقونة تحت هذه الظروف. يكون متوسط معيار الفيرويد NgSVd ١٦,٠ ميكوغرام لكل غرام نسيج في شهور الشتاء، يكون هذا المعيار ٣٧,٠ ميكوغرام / غرام نسيج نباتي في شهور الصيف.

يصيب الفيرويد نباتات من العائلة البقولية (أول فيرويد يذكر في هذا الموضوع) حيث يصيب جنس البسلة الهندية.

المدى العائلي للفيرويد:

نباتات الدخان *N. glutinosa* المحقونة بالفيرويد (NgSVd) المستخلص من النباتات المصابة يظهر عليها جميع مواصفات الأعراض المرضية المذكورة سابقاً وتبقى النباتات عقيمة. أمكن نقل الفيرويد بنجاح إلى عدة أنواع من العائلة الرمرامية *Chenopodiaceae* والقرعية والبقولية والباذنجانية. وهي كالاتى:-

١ - *Chenopodium amaranticolor* تسبب الإصابة الفيرويدية على هذا النبات ظهور بقع موضعية شاحبة يتبع ذلك تدلى الأوراق ثم موزايك متبرقش على الأوراق وتقرم في النباتات.

٢ - *Cucumis sativus* يظهر على الأوراق بقع كبيرة شاحبة وتتجدد قمم الأوراق وتتشق لأسفل وكذلك تلتف حواف الأوراق إلى أسفل.

٣ - *Luffa acutangula* يظهر على الأوراق موزايك متبرقش معتدل مع حواف غير منتظمة وتجدد قمم وحواف الأوراق إلى أسفل.

٤ - *N. clelandii* يظهر على النبات أعراض تدلى وشحوب الأوراق وتقرم ومظهر القمة الشجرية في النبات.

٥ - *N. debacnyi* يظهر تدلى ونكروزز على الأوراق.

٦ - *N. plumbaginifolia* يظهر أعراض شديدة تتمثل في التفاف الأوراق إلى أعلى.

٧ - *Nicotiana sp.* لا يتكون أزهار على أنواع هذا الجنس.

٨ - *Cajanus cajan* هذا أول جنس من العائلة البقولية يصيبه الفيرويد. يظهر على النباتات المصابة نكروزز في المروق على الأوراق المحقونة أما الأوراق

غير المحقونة في نفس النبات يظهر عليها بقع على شكل بثرات على الأوراق الثلاثية.

٩ - *Vigna unguiculata* تظهر الأعراض على شكل بثرات على الأوراق ونكروزز العروق بعد ١٥ - ٢٠ يوم من الحقن.

لا يصيب هذا الفيروس نباتات الطماطم التي هي عامل كاشف شائع لكثير من الفيروسات وهذه الصفة تجعله يتميز عن كثير من الفيروسات التي تهاجم الطماطم أو تكون الطماطم كاشف لها.

بقية صفات الفيروس لا تزال تحت الدراسة.

نشرة هذا البحث في مجلة Plant Disease سنة ١٩٩١ مجلد ٧٥ عدد ١٠ صفحة ١٠٦٨ إلى ١٠٧١.

٢ - فيروس تقزم القرنفل

Carnation Stunt Viroid

مقدمة:

كان أول وصف لهذا المرض (مرض تقزم القرنفل) في الولايات المتحدة الأمريكية سنة ١٩٨٣ من قبل العالم Lominel و Morris وإن التحليل بواسطة طريقة PAGE أكد أن التركيب الدائري للحمض RNA الفيرويدي ذو وزن جزيئي حوالي ٨٠٠٠٠ - ٨٥٠٠٠ دالتون. ينتشر هذا المرض في كل من إيطاليا وأسبانيا.

الأعراض:

أعراض المرض تكون على شكل تقزم، تشوهات ونموات كثيرة غير عادية للساق، إنخفاض عقد الإزهار والأزهار التي تتكون تكون مشوهة. الاختبارات التي أجريت في إيطاليا على العينات المصابة أظهرت أن RNA الصغير المرافق للمرض

موجود فى شكلين دائريين أحدهما بطى والأخر سريع فى الهجرة الكهربائية فى الجيل يشار إليهما Carnation Stunt Associated Viroids الأول يسمى (Car SAV - slow) أما الآخر فيشار إليه (Car SAV - fast). الفيروس ذو الشكل البطى Car SAV - slow قدر حجمه فوجد أنه يتكون من ٢٨٠ نيوكليتيده وإن جزء من هذا التابع تبين أنه يمكن أن ينشئ ويأخذ تركيب رأس المطرقة كتلك المتوقع أنها تعمل لإنشطار ذاتى فى المعمل للفيروسين النباتيين ASBVd و PLMVd وفى فيروساتيدات النبات ونسخ من فيروسايد السمندل Newt Satellite 2 DNA.

الكائن المسبب:

لم يتأكد بعد فيما إذا كان مسبب هذا المرض فيروس أو فيروسايد لأن فيه صفات كثيرة مشتركة بين هاتين المجموعتين من المسببات المرضية. لذلك لا يشار إليه بأنه فيروس بل بأنه مرافق لتقرم القرنفل (Car SAV) وإذا قلنا فى هذا الشرح كلمة فيروس فإن ذلك من باب المجاز فقط.

درس تتابع نيوكليتيديات RNA الدائرى المعزول من نبات القرنفل المصاب بالتقرم وتبين أنه يتكون من ٢٧٥ نيوكليتيده تتخذ شكل التركيب الثانوى المتفرع عند أقل حرارة حرة. إن كل من الخيوط السالبة والموجبة لهذا الحمض تستطيع أن تشكل تركيب رأس المطرقة المفترض بأنه وسيط فى الإنشطار الذاتى فى المعمل. إن النسخ السالبة كاملة الطول والأخرى غير الكاملة من فيروس تفرم القرنفل الدائرى الشاملة تركيب رأس المطرقة تظهر عملية الإنشطار الذاتى خلال النسخ وبعد التنقية، هذا يدل على دخول تركيب رأس المطرقة المفرد فى تفاعل الانشطار الذاتى. أما فى حالة النسخ الموجبة فإنه فقط الدايمرك Dimeric RNA وليس ال monomeric عندها كفاءة الانشطار الذاتى خلال النسخ والتنقية وهذا يقوى بشدة دخول رأس المطرقة المزدوج فى الإنشطار الذاتى أكثر من إنشطار النطاق المفرد. وعلى أية حال فإن نسخ موجبة من monomeric تنشط ذاتياً بعد التنقية بمعدل منخفض فى تفاعل معتمد على التركيز والذى أكثر احتمالاً بأن يحدث خلال ميكائزم بين

الجزئيات Intramolecular mechanism. إن مقارنة تحليل التتابع قد أظهر أن فيروس القزمو القرنفل الدائري يشترك في تشابهات كثيرة مع بعض الفيروسات أو الفيروسات. إن الحمض النووي RNA الصغير الدائري والذي يمكن أن يكون فيروس أو فيروسايد هو المسبب لأعراض القزمو القرنفل.

العزلة الأسبانية:

الدراسات التي أجريت على هذا المرض في أسبانيا ذكرت أن RNA الدائري الذي يصيب القرنفل يتكون من ٢٧٥ نيوكليتيده وهو قريب الشبه مع تلك الفيروسات المعروفة في إيطاليا والولايات المتحدة ومع أن كثير من الأبحاث قد أكدت بأن هذا المسبب فيروس إلا أن هناك بعض التحفظات على ذلك.

استمرت الدراسات على عزلة أسبانيا ذو الحجم ٢٧٥ نيوكليتيده ووجد أن هذه النيوكليتيديات تتكون من ٨٤ G بنسبة ٣٠,٥٪، ٥٧ C بنسبة ٢٠,٧٪، ٦٢ A بنسبة ٢٢,٥٪ و ٧٢ U بنسبة ٢٦,٥٪ وبالتالي يكون G+C بنسبة ٥١,٢٪. إن التركيب الثانوي المتكون على أقل طاقة حرة يميل إلى التكوين المتفرع وأن ٧٠,٥٪ من مراكزه تكون في أزواج بحيث تكون GC بنسبة ٤٧,٤٪ و AU بنسبة ٣٦,١٪ و GU بنسبة ١٦,٥٪.

إن التحليل المقارن لتركيبات رأس المطرقة للفيروس Car SAV يبين أن هذا الفيروس يمكن أن يشكل تركيبات رأس المطرقة في كل من قطبي الشريطين كما هو الحال في فيروس ASBVd وفيروس PLMVd وفيروسات sLTSV و sBYDV. كما وأن التكوينات الناشئة من أقل طاقة حرة من المونومرك الموجب والسالب والداي مرك السالب في Car SAV RNAs لا تحتوي تركيبات رأس المطرقة وبالتالي فإن النسخ النقية المتوافقة غير متوقع لأن تعمل لإنشطار ذاتي مالم تتعرض إلى حرارة قبل المعاملة لتشجيع ظهور التكوينات البديلة المحتوية على تركيبات رأس المطرقة.

إن المونومرك السالب والداى مرك الموجب فى Car SAV RNAs يكون فيها الإنشطار الذاتى خلال النسخ وبعد التنقية أكثر احتمالاً من أن يكون خلال تركيبات رأس المطرقة المفرد والثنائى بالترتيب، وهذا يشبه ASBVd RNA. كذلك فإن تركيب رأس المطرقة من Car SAV RNA يمتلك الحلزون (اللؤلؤ) رقم ٣ وكذلك ثلاثة عروات مشابهة فى RNA فى السمندل (بعض الحيوانات). وتمشياً مع نظريات عدم الثبات لتركيب رأس المطرقة فإنه من الصعب اكتشاف الإنشطار الذاتى فى المونومرك الموجب لـ Car SAV RNA خلال النسخ، بينما الإنشطار الذاتى فى الداى مرك الموجب لـ Car SAV RNA يحدث بكفاءة خلال النسخ وبعد التنقية وهذا يؤكد دخول تركيب رأس المطرقة المزدوج فى هذا التفاعل. وهذه النتائج تنطبق مع نتائج الأبحاث على بعض الفيروسات.

ولغاية سنة ١٩٩٤ لا يوجد تأكيدات على أن Car SAV هو من ضمن الفيروسات أو من ضمن الفيروسات والأبحاث القادمة إن شاء الله هى التى سوف تؤكد ذلك.

نشر هذا المقال فى مجلة Nucleic Acid Research, 1992, Vol. 20. No. 6323 - 6329.

٣- فيروس لفة أوراق القمح

Wheat Leaf Blight Viroid

ذكرت مجلة China J. Virology الصادرة سنة ١٩٨٧ فى الصفحة ١٧٣ - ١٧٦. أن هناك فيروس يصيب القمح يؤدي إلى لفة الأوراق واصفرارها وهو فيروس كامن فى الجيوب ويسبب المرض المسمى Seed - borne Yellow Leaf Blight Disease. تظهر أعراض هذا المرض على شكل مناطق صفراء متطاولة على نصل الورقة، يظهر فى منتصف هذه المناطق بقع متحللة ذات لون بنى. إذا كانت الأعراض شديدة تظهر نباتات القمح وكأنها ملفوطة. يحدث التباس فى تشخيص هذه الأعراض مع بعض الإصابات الفطرية، إلا أن الفحص الميكروسكوبى يضع تمييزاً لذلك.

بالفحص الميكروسكوبى للخلايا فى منطقة الإصابة (الصفراء قبل التحلل) يظهر تحطيم واختفاء أجزاء من الغشاء النووى ويحدث تغيرات فى السيتوبلازم بالقرب من النواة ويحدث تمدد فى قطر الأربطة بلازمودسماتا Plasmodesmata ويصبح قطر بعضها أكبر من ١٠٠ نانومتر.

٤ - فيروس اللجستروم

Privet Viroid

فى المجلة الصينية السابقة ولكن فى عدد آخر. Chaina J. VIROL عدد رقم ٣ فى الصفحة ٥٣ - ٦١ الصادرة سنة ١٩٨٧. ذكرت أن نبات اللجستروم *Ligustrum compactum* يصاب بفيروس ذو شكل دائرى مغلق ويتكون من عديد من قواعد الأزواج وأن وزنه الجزيئى ٠,٧ × ١٠^٥ دالتون. وأن هذا الفيروس لا ينتقل إلى نبات *Gynura aurantiaca*.

٥ - فيروس الإصفرار المميت فى نخيل الزيت

Oil Palm Fatal Yellowing Viroid

ذكر هذا الفيروس فى مجلة 392 - 394 (4): Fitopatol. BRAS 13 الصادرة سنة ١٩٨٨. تذكر هذه المجلة أن أعراض المرض المتسببة عن هذا الفيروس فى أشجار نخيل الزيت *Elaeis guineensis* تظهر على شكل إصفرار على الأوراق يستمر هذا الإصفرار فى الزيادة حتى يشمل الورقة كلها وتموت.

٦ - فيروس الموزايك المبرقش فى البسلة الهندية

Pigeon Pea Mosaic Mottle Viroid

لقد وجد أن هناك حمض نووى RNA منخفض الوزن الجزيئى ١,٣ × ١٠^٥ دالتون عزل من نباتات البسلة الهندية *Cajanus cajan* فى الهند ويسبب هذا الفيروس مرض فى البسلة الهندية هو الموزايك المبرقش. تظهر الأعراض على شكل موزايك متبرقش فى الأوراق، صفر فى حجم الأوراق، تقزم النبات وعدم الإزهار. يمكن نقل هذا النبات بالحقن الميكانيكى ويصيب كل من:-

1 - *Nicotiana glutinosa*

2 - *N. clevelandii*

3 - *Chenopodium amaranticolor*

إن هذا الفيرويد يختلف عن فيرويد تقزم الدخان البرى الذى ذكر سابقاً *N. glutinosa* Stunt Viroid. إن هذا الفيرويد (فيرويد الموزايك المبرقش فى البسلة الهندية) أول فيرويد يذكر بأنه يصيب البقوليات.

هذا المقال فى مجلة 55 - 60 (1): 137 *J. of Phytopathology* الصادرة سنة ١٩٩٣.

V - فيرويد تقزم الأرقطيون

Burdock Stunt Viroid

ذكرت مجلة 147 - 155 (2) 29 *SCI SIN SER B* الصادرة سنة ١٩٨٦ أن نبات الأرقطيون *Arcetium tomentosum* وهو من النباتات الطبية يتبع العائلة المركبة وتنتشر زراعته فى أوروبا والصين وكذلك النوع *A. lappa* يصابان بنوعين من الفيرويدات التى تسبب تقزم النبات وتبرقش الأوراق كما وأن الكالوس المتكون من الأوراق المريضة ينمو ببطء أكثر إذا قورن مع المتكون من الأوراق السليمة. كذلك فإن تكاثر إحدى الفيرويدات فى الكالوس يكون أسرع خلال الستة إلى ثمانية شهور الأولى. الفيرويدان على درجة عالية من تزاوج القواعد وهما يأخذان التركيب الدئرى والشكل شبه العصوى. الوزن الجزيئى للأول ١,٨ × ١٠^٥ دالتون والوزن الجزيئى للثاني ١,٧ × ١٠^٥ دالتون، وهما أكثر ثباتاً للحرارة من كثير من الفيرويدات الأخرى. لم يحدث أن عزل الفيرويدين معاً من نبات واحد مصاب.

بهذا نختم كتابنا بالحمد لله رب العالمين

«وآخر دعوانهم أن الحمد لله رب العالمين»

المراجع

مكتب

- ١ - فتحى محمد عبدالنواب. البيولوجيا الجزيئية (مدخل الهندسة الوراثية). ١٩٩٣. المكتبة الأكاديمية القاهرة. ٤١٥ صفحة.
- ٢ - فوزى طه قطب. النباتات الطبية - ١٩٧٩ - الدار العربية للكتاب - ليبيا - تونس - ٣٥٧ صفحة.
- 3 - Abraham, M., B. Harrow. 1971. Biochemistry. Tenth edition. W. B. Saunders Company. London. 727. pp.
- 4 - Agrios, G. N. 1988. .Plant Pathology. 3rd edition. Academic press INC. New York. 800 pp.
- 5 - Buczacki, S. T. and Harris, K. M. 1982. Pests, Diseases and Disorders of garden plants. Collins St. James place London 512 pp.
- 6 - Francik, R. I. B. *et al.* 1991. Classification and Nomenclature of viruses. Fifth Report of The International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer - Verlag Wien. New York. 450 pp.
- 7 - Mandahar. C. L. 1978. Introduction to plant viruses. S. Chand and Company LTD. New Delhi. pp. 333.

- 8 - Maramorocch, K. 1991. Viroids and satellites Molecular Parasites at the Frontier of life. CRC Pres, INC. p. 21 - 58.
- 9 - Roberto, C. 1984. Medical Plants. Macdoland Press London. pp 447. In the English translation. Arnoldo Mondadori Editore S. P. A., Milan.
- 10 - Smith, K. M. 1979. Plant Viruses. Sixth edition. John Wiley Sons. New York 241 pp.
- 11 - Walter, R., E. C. Calavand and G. E. Corman. 1978. Citrus industry volum IV. University of Califorina pp. 365.

ملاحظات :-

- ١ - الأبحاث والمجلات المذكورة هنا مرتبة حسب سنوات البحث.
- ٢ - هناك مراجع خاصة ومحددة في نهاية كل فصل من الكتاب في الجزء الأول.

أبحاث ومجلات

أبحاث سنة ١٩٩٤

- 1 - Andrew, G. R. and R. H. Symons. 1994. Infectivity of Linear Monomeric Transcripts of Citrus Exocortis viroid. *Virology* 203: 328 - 335.
- 2 - Chela - Flores, J. 1994. Are viroids molecular fossils of the RNA world? I. *Theoretical Biology* 166 (2) 163 - 166.
- 3 - Domingo, C., V. Conejero and P. Vera. 1994. Genes encoding acidic and basic Class III B-1,3 glucanases are expressed in tomato plants upon viroid infection. *Plant Molecular Biology* 24 (5): 725 - 732.
- 4 - Lima, M. I, *et al.* 1994. Detection of avocado Sunblotch viroid in chloroplasts of avocado leaves by in situ hybridization. *Virology* 138: 385 - 390.
- 5 - Maria, E. N., L. H. Marcellino, E. W. Kitajima. 1994. Nucleotide sequence of the original Brazilian isolate of coleus yellow viroid. *J. General Virol.* 75, 1447 - 1449.
- 6 - Semancik, J. S. and J. A. Szychowski. 1994. Avocado sunblotch disease. *J. General Virology* 75 (7) 1543 - 1549.
- 7 - ———, ———, ———, Rakowski, A. C., and R. H. Symons. 1994. A stable 463 nucleotide variant of citrus exocortis viroid produced by terminal repeats. *J. General Virology* 75 (727 - 732).
- 8 - Takahashi, T., S. Shimakoshi *et al.* 1994. Cytopathology of resin glands from hop plants infected with hop stunt viroid. *Zeitschrift f. Pflanzenschutz* 100 (5) 508 - 515.

- 9 - Tornero, P., V. Conejero and P. Vera. 1994. A gene encoding a novel isoform of the PR-1 protein family from tomato is induced upon viroid infection. *Molecular and General Genetics* 243 (1) 47 - 53.
- 10 - Wassenegger, M. *et al.* 1994. RNA - directed de novo methylation and genomic sequences in plants. *Cell* (Cambridge) 76 (3) 567 - 576.

أبحاث سنة ١٩٩٣

- 11 - Fonseca, M. E., V. L. Marinho and T. Nagata. 1993. Hop latent viroid in hop Germ Plasm Introduction into Brazil from U. S. A. *Plant Dis.* 77 : 952.
- 12 - ——— , ——— and E. W. Kitajima. 1993. French Marigold. A New Experimental Host of Citrus Excocortis Viroid. *Plant Dis.* 77 : 953.
- 13 - He, X. Y., G. H. Zhou and A. S. Liu. 1993. Identification of strains of potato spindle tuber viroid. *Acta Phytopathologica Sinica* 23 (4): 361 - 365.
- 14 - Ito, T. *et al.* 1993. Detection of a viroid associated with apple fruit crinkle disease. *Annals Phytopath Society Japan.* 59: 520 - 527.
- 15 - Lakshman, D. K. and S. M. Tavantzis. 1993. Primary and secondary structure of a 360 - nucleotide isolate of potato spindle tuber viroid. *ARCH Virol.* 128 (3 - 4): 319 - 331.
- 16 - Marcos, J. F. and R. Flores. 1993. Self - cleavage reaction of avocado sunblotch viroid RNAs is present in naturally occurring linear viroid molecules. *J. GEN. VIROL.* 74 (5): 907 - 910.
- 17 - Matousek, J., Rakousky S. 1993. Antisense DNA inhibits infections

- of potato spindle tuber viroid. *Folia Biologica* 39 (2): 87 - 99.
- 18 - Matousek, J. *et al.* 1993. Inhibition of potato spindle tuber viroid infection with DNA oligonucleotides. *Biochimie* 75 (1 - 2) 63 - 69.
- 19 - Morton, A., D. J. Barbara and A. N. Adams. 1993. The distribution of hop latent viroid within plant of *Humulum lupulus*. *Annals of Applied Biology* 123 (1): 47 - 53.
- 20 - Ou, F. C. *et al.* 1993. Multiple pathways of reversion in viroids for conservation of structural elements. *EMBO J.* 12 (5): 2129 - 2139.
- 21 - Podleckis, E. V. *et al.* 1993. Chemiluminescent detection of potato and poma fruit viroids. *J. Virol Methods* 43 (2): 147 - 158.
- 22 - Rigden, J. B. and M. A. Rezaian. 1993. Analysis of sequence variation in grapevine yellow speckle viroid 1 reveals two distinct alternative structures for the pathogenic domain. *Virology* 193 (1) 474 - 477.
- 23 - Rodriguez, M. J. B., J. W. Randles. 1993. Coconut cadang-cadang viroid mutants associated with severe disease vary in both the pathogenicity and the central conserved region. *Nucleic Acids Research* 21 (11) : 2771.
- 24 - Rodrigo, I. *et al.* 1993. cDNA cloning of viroid-induced tomato pathogenesis-related protein P. 23. *Plant Physiology* 102 (3) : 939 - 945.
- 25 - Semancik, J. S. *et al.* 1993. Isolation of citrus exocortis viroid recovered by host and tissue selection. *J. General Virology* 74 (11) : 2427 - 2436.

- 26 - Sing, R. P., A. Boucher and T. H. Somerville. 1993. Interaction between a mild and a severe strain of potato spindle tuber viroid. *AM. Potato J.* 70 : 85 - 92.
- 27 - Skrzeczkowski, L. J., W. E. Howell and G. I. Mink. 1993. Correlation between leaf epinasty symptoms on two apple cultivars and results of cRNA hybridization for detection of apple scar skin viroid. *Plant Disease* 77 - (9) - : 919 - 921.
- 28 - Stocker, S., M. C. Guitton and H. P. Muhlbach. 1993. Photosynthetically active suspension cultures of potato spindle tuber viroid infected tomato cells as tools for studying viroid host cell interaction. *Plant Cell Reports.* 12 (11) : 597 - 602.

أبحاث سنة ١٩٩٢

- 29 - Adams, A. N. *et al.* 1992. The distribution and spread of hop latent viroid within two commercial plantings of hop. *Ann Appl Biol.* 121 (3) 585 - 592.
- 30 - Ashulin, L., M. Mawassi and M. BAR-Joseph. 1992. procedure to amplify cDNA from viroid RNA templates using the polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol.* 3 (2) : 83 - 89.
- 31 - Giunchedi, L. *et al.* 1992. Symptoms of latent mosaic on peach in Emilia - Romagna. *Informatore Fitopatologico* 42 (3) : 47 - 49.
- 32 - Hadas, R., L. Ashulin and M. BAR - Joseph. 1992. Transmission of a citrus viroid to avocado by heterologous grafting. *Plant Disease* 76 (4) : 357.

- 33 - Hataya, T., *et al.* 1992. Detection of hop latent viroid using reverse transcription and polymerase chain reaction. *Ann Phytopath. Soc. JPN* 58 (5): 677 - 684.
- 34 - He, X. Y., *et al.* 1992. detection of potato spindle tuber viroid by polymerase chain reaction. *Virol Sin* 7 (3): 362 - 366.
- 35 - Herold, T. *et al.* 1992. Sequence analysis of five new field isolates demonstrates that the chain length of potato spindle tuber viroid is not strictly conserved but as variable as in other viroids. *Plant Mol Biol* 19 (2): 329 - 333.
- 36 - Hernandez, C. *et al.* 1992. Pear blister canker viroid is a member of the apple scar skin subgroup and also has sequence homology with viroids from other Subgroups. *J. Gen Virol.* 73 (10): 2503 - 2507.
- 37 - ————, ———— and R. Flores. 1992. plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave *in vitro* via hammer-head structure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89 (9): 3711 - 3715.
- 38 - Kryczynski, S., A. Stawiszynska, S. Skrzeczkowska. 1992. Pollen transmission of potato spindle tuber viroid to pollinated potato plants. *Horticulture* 16: 59 - 64.
- 39 - Kyriakou, A. P. 1992. Incidence of Cyprus of citrus exocortis viroid and its mechanical transmission. *Plant Pathol (OXF)* 41 (1): 20 - 24.
- 40 - Marcos, J. F. and R. Flores. 1992. Characterization of RNAs specific to avocado sunblotch viroid synthesized *in vitro* by a cell-free system from infected avocado leaves. *Virology* 186: 481 - 488.

- 41 - Meldrals, Ya. A. *et al* 1992. Detection of potato spindle tuber viroid and chrysanthemum stunt viroid using biotinylated oligodeoxyribonucleotide. *Mol Biol* (Mosco) 26 (3): 540 - 545.
- 42 - Owens, R. A. *et al* 1992. A new mild strain of potato spindle tuber viroid isolated from wild *Solanum* spp. in India. *Plant Disease* 76 (5): 527 - 529.
- 43 - Randles, J. W. and D. Hanold. 1992. Indexing of coconut germplasm for viroid and virus. *IBPGR* 44 - 45 ISBN 92 - 9043 - 217 - 9.
- 44 - Rezaian, M. R., L. R. Krake and D. A. Golino. 1992. Common identity of grapevine viroids from USA and Australia revealed by PCR analysis. *Intervirology* 34 (1) : 38 - 43.
- 45 - Rigden, J. E. and M. R. Rezaian. 1992. *In Vitro* Synthesis of an infectious viroids: Analysis of the infectivity of monomeric linear CEV. *Virology*. 186 (1): 201 - 206.
- 46 - Sano, T. *et al* 1992. Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 89 (21) 10104 - 10108.
- 47 - Schindler, I. M. and H. P. Muehlbach. 1992. Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: A reevaluation. *Plant Sci* 84 (2): 221 - 229.
- 48 - Semancik, J. S. and J. A. Szychowski. 1992. Relationships among the viroids from grapevine. *J. Gen Virol*. 73 (6) 1465 - 1469.
- 49 - ————, ———— D. J. Gumpf and J. A. Bash. 1992. Interference between viroids inducing excocortis and cachexia diseases of citrus. *Ann. Appl Biol*. 121 (3): 577 - 583.

- 50 - Singh, R. P. *et al.* 1992. Potato spindle tuber viroid is not encapsidated *in vivo* by potato virus Y particles. *Can J. Plan Patho.* 14 (1) : 18 - 21.
- 51 - Singh, R. P., A. Boucher and T. H. Somerville. 1992. Detection of potato spindle tuber viroid in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid - infected pollen. *Plant Disease* 76 (9) 951 - 953.
- 52 - Singh, R. P. *et al.* 1992. A viroid from *Nematanthus wettseini* plants closely related to the *Columnea latent* viroid. *J. Gen Virol.* 73 (11) : 2769 - 2774.
- 53 - Steger, G. *et al.* 1992. Structural requirements for viroid processing by RNase. T.1. *J. Mol Biol.* 227 (3) 719 - 739.
- 54 - Takahashi, T. *et al.* 1992. Growth characteristics in cultured cucumber tissues infected with hop stunt viroid. *J. Phytopath* 136 (4): 288 - 296.
- 55 - Takahashi, T. *et al.* 1992. Comparison of plant hormone requirements in leaf tissues from hop stunt viroid-infected and uninfected hop plants. *Z. P. PFLANZEN SCHUTZ* 99 (1): 62 - 70.
- 56 - Welinicki, M. and C. Hiruki. 1992. Highly sensitive digoxigenin - labelled DNA probe for the detection of potato spindle tuber viroid. *J. Virol Method* 39 (1-2): 91 - 99.
- 57 - Yang, X., A. Hadidi and S. M. Garnsey. 1992. Enzymatic cDNA amplification of citrus excocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. *Phytopathology.* 83 (3): 279 - 285.

أبحاث سنة ١٩٩١

- 58 - Ashulin, L. *et al* 1991. Nucleotide sequence of a new viroid species, citrus bent leaf viroid isolated from grapefruit in Isreal. *Nucleic Acid Res.* 19 (17): 4767.

- 59 - Belles, J. M., J. Carbonell and V. Conejero. 1991. polyamines in plants infected by citrus exocortis viroid or treated with silver ions and ethephon. *Plant Physiology* 96 (4): 1053 - 1059.
- 60 - Bianco, P. A. and G. A. Vegetti. 1991. Detection and identification of chrysanthemum stunt viroid in Italy. *Riv Patol Veg* 1 (2-3): 43 - 50.
- 61 - Elena, S. F. *et al* 1991. Phylogeny of viroids, viroid - like satellite RNAs and the viroid-like blister canker disease. *PROC Natl Acad Sci USA* 88 (13): 5631 - 5634.
- 62 - Flores, R. *et al*. 1991. Identification of a new viroid as the putative caused agent of pear blister canker disease. *J. Gen Virol*. 72 (6): 1199 - 1204.
- 63 - Gillings, M. R., P. Broadbent and B. I. Gollnow. 1991. Viroids in Australian Citrus: Relationship to exocortis, cachexia and citrus dwarfing. *Aust J. Plant Physiol* 18 (5): 559 - 570.
- 64 - Hadidi, A., A. J. Hansen, C. L. Parish and X. Yanc. 1991. Scar skin and dapple apple viroids are seed-borne and persistent in infected apple trees. *Res Virol* 142 (4): 289 - 296.
- 65 - Hanold, D. and J. W. Randles. 1991. Detection of coconut cadang - cadang viroid - like sequences in oil and coconut palm and other monocotyledons in the South - west Pacific. *Ann. Appl. Biol.* 118 (1): 139 - 152.
- 66 - Harty, A. 1991. Exocortis viroid in New Zealand. *Orchardist of New Zealand* 64 (9) 38 - 39.
- 67 - Hopp, H. E. *et al*. 1991. Development and application of a nonradioactive nucleic acid hybridization system for simultaneous detection of four potato pathogens. *J. Virol Method* 31 (1): 11 - 30.

- 68 - Kanematsu, S. *et al.* 1991. Comparison of nonradioactive cDNAR probes for detection of potato spindle tuber viroid by dot-blot hybridization assay. *J. Virol Methods* 35 (2): 189 - 199.
- 69 - Kryczynski, S., A. Stawiszynska and S. Skazczkowska. 1991. Detection of potato spindle tuber viroid in composite plant samples. *Phytopathologica - Polonica* 12 : 29 - 32.
- 70 - Loss, P. M., *et al.* 1991. formation of thermodynamically metastable structure containing hairpin II is critical for infectivity of potato Spindle tuber RNA. *EMBO J.* 10 (3): 719 - 728.
- 71 - Matousek, J. *et al.* 1991. An immunochemical testing of pathophysiological reactions of several PSTVd infect tomato. *Biol Plant* 33 (5): 358 - 365.
- 72 - ———, *et al.* 1991. Instable expression of potato spindle tuber viroid complementary DNA trasformed potato. *Arch Phyto., Z.* 27 (3) 167 - 173.
- 73 - Meldrais, Ya. A., I. E. Line and T. I. Gurinovich. 1991. Chrysanthemum stunt viroid cDNA cloning into plasmid pUC19 and the cloned cDNA for detection of chrysanthemum stunt viroid. *Mol Biol. (Mosco)* 25 (5): 1301 - 1307.
- 74 - Mishra, M. D. *et al.* 1991. Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of citrus excocortis viroid. *J. Gen Virol.* 72 - (8): 1781 - 1786.
- 75 - Singh, R. P. *et al.* 1991. Differential migration during polyacrylamide gel electrophoresis suggests conformational differences among strains of potato spindle tuber viroid. *Can. J. Plant Pathol.* 13 - (3) 202 - 211.

- 76 - Singh, R. P., A. Boucher and R. G. Wang. 1991. Detection, distribution and longterm persistence of potato spindle tuber viroid in true potato seed from China. *Potato J.* 68 (1) : 65 - 74.
- 77 - ———, ———, and A. Singh. 1991. High incidence of transmission and occurrence of a viroid in commercial seeds of *Coleus* in Canada. *Plant Disease* 75 (2): 184 - 187.
- 78 - Trnena, L. and J. Matousek. 1991. Aminopeptidase activity in potato spindle tuber viroid infected tomato leaves. *Phytopathol PF lanzenschutz* 27 (2): 117 - 125.
- 79 - Tsagris, M., M. Tabler and H. L. Saenger. 1991. RNase T₁ generates circular RNA molecules from viroid-specific RNA transcripts by cleavage and intramolecular ligations. *Nucleic Acid Res.* 19 (7): 1605 - 1612.
- 80 - Ziegler, A., E. Reiss and J. Schubert. 1991. Detection of potato spindle tuber viroid with nonradioactive hybridization probes. *Arch phytopath. Z.* 27 (5): 411 - 414.

أبحاث سنة ١٩٩٠

- 81 - Barbara, D. J. et al. 1990. Some effects of hop latent viroid on two cultivars of hop in the UK. *Ann. Appl Biol.* 117 (2): 359 - 360.
- 82 - Barbara, D. J., A. Morton and A. N. Adams. 1990. Assessment of UK hops for the occurrence of hop latent and hop stunt viroids. *Ann. Appl. Biol.* 116 (2): 265 - 272.
- 83 - Belles, Joes M., A. Granell and V. Conejero. 1990. Impairment of viroid infection in *G. aurantiaca* plants by treatment with ethephon. *Can J. Plant Pathol* 12 (2): 175 - 179.
- 84 - Candresse, T., T. O. Diener and R. A. Owens. 1990. The role of the

- viroid central conserved region in complementary DNA infectivity. *Virology* 175 (1): 232 - 237.
- 85 - Duran-Vila, N. and J. S. Semancik. 1990. Variations in the crossprotection effect between two strains of citrus exocortis viroid. *Ann. Appl. Biol.* 117 (2): 367 - 378.
- 86 - Dusi, A. N., M. E. N. Fonseca and A. C. Deavila. 1990. Occurrence of a viroid in chrysanthemum in Brazil. *Plant Pathol. (OXF)* 39 (4): 636 - 637.
- 87 - Flores, R. *et al.* 1990. Some properties of the viroid inducing peach latent mosaic disease. *Res Virol* 141 (1): 109 - 118.
- 88 - Hu, K., Z. Yong-Zhi and d. DA-Ming. 1990. Effect of some chemicals on infectivity and replication of citrus exocortis viroid. *Virol sin* 5 (4): 410 - 418.
- 89 - Hadidi, A. *et al.* 1990. Homology of the agent associated with dapple apple diseases to apple scar skin viroid and molecular detection of these viroids. *Phytopathol.* 80 (3): 263 - 268.
- 90 - ———, ——— and X. Yang. 1990. Detection of pome Fruit viroids by enzymatic complementary DNA amplification. *J. virol. Methods* 30 (3): 261 - 270.
- 91 - Juarez, J. *et al.* 1990. Separation of citrus viroids by shoot - tip grafting *in vitro*. *Plant Pathol. (OXF)*. 39 (3): 472 - 476.
- 92 - Jiang, L., C. Wel, T. Poand and L. Yi. 1990. Temperature - gradient gel electrophoresis of apple scar skin viroid. *Acta Microbiol Sin* 30 (4): 278 - 283.
- 93 - Marcos, J. F. and R. Flores. 1990. Subcellular location of avocado viroid in avocado leaves. *Plant Sci* 67 (2): 237 - 244.
- 94 - Owens, R. A. 1990. Mutational analysis of viroid pathogenicity: To-

- mato apical stunt viroid. *Mol Plant Microbe Interact* 3 (6): 374 - 380.
- 95 - Owens, R. A., T. Candresse and T. O. Diener. 1990. construction of novel viroid chimeras containing proteins of tomato apical stunt and citrus exocortis viroids. *Virology* 175 (1) 238 - 246.
- 96 - Rezaian M. A. 1990. Australian grapevine viroid evidence for extensive recombination between viroids. *Nucleic Acids Res* 18 (7): 1813 - 1818.
- 97 - singh, R. P., A. Boucher and T. H. Somerville. 1990. Cross - protection with strains of potato spindle tuber viroid in the potato plant and other solanaceous hosts. *Phytopath.* 80 (3) 246 - 250.
- 98 - — , — and G. C. C. Tai. 1990. High levels of viroid in tomato and potato plants inoculated with minimal amounts of potato spindle tuber viroid. *Can J. Plant Pathol* 12 (1): 11 - 15.
- 99 - Vera, P. and V. Conejero. 1990. Citrus exocortis viroid infection alters the *in vitro* pattern of protein phosphorylation of tomato proteins. *Mol Plant-Microbe Interact* 3 (1): 28 - 32.
- 100 - Welnicki, M. *et al* 1990. Detection of potato spindle tuber viroid by molecular hybridization and bioassay. A large - scale comparison. *Potato Research* 33 (4) 497 - 503.
- 101 - Yokoyama, M. *et al*. 1990. Detection of specific RNA by in situ hybridization in plant protoplasts. *Plant Cell Physi.* 31 (3): 403 - 406.
- 102 - Zekanowski, C. *et al*. 1990. Detection of PSTVd in dormant potato tubers by concatameric complementary DNA probe. *J. Virol. Methods.* 30 (1): 127 - 130.

أبحاث سنة ١٩٨٩

- 103 - Flores, R. 1989. Synthesis of RNA specific to citrus exocortis viroid. *J. Gen Virol.* 70 (10): 2695 - 2706.
- 104 - Fonseca, M. E. *et al.* 1989. A small viroid in *Coleus* sp. from Brazil. *Fitopathol Bras* 14 (1): 94 - 96.
- 105 - Galindo, J., C. Lopez and T. Aguilar. 1989. Discovery of the transmitting agent of tomato planta macho viroid. *Rev Mex Fitopatol* 7 (1) 61 - 65.
- 106 - Hammond, R. W., T. O. Diener and R. A. Owens. 1989. Infectivity of chimeric viroid transcripts reveals the presence of alternative processing sites in potato spindle tuber viroid. *Virology* 170 (2) 486 - 495.
- 107 - ——— , ——— , ——— and d. R. Smith. 1989. Nucleotide sequence and proposed secondary structure of *Columnnea* latent viroid. *Nucleic acids Res.* 17 (23): 10083 - 10094.
- 108 - Harders, J. *et al.* 1989. Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *EMBO J.* 8 (13): 3941 - 3950.
- 109 - Jaswal, M. S. 1989. Reuse of buffers in return polyacrylamide gel electrophoresis tests for the detection of potato spindle tuber viroid. *AM. Potato J.* 66 (12): 813 - 820.
- 110 - Kondakova, O. A. *et al.* 1989. Potato spindle tuber viroid does not complement TMV temperature-sensitive transport function. *J. GEN Virol.* 70 (6): 1609 - 1612.
- 111 - Koltunow, A. M. *et al.* 1989. Two related viroids cause grapevine yellow speckle disease independently. *J. GEN. Virol.* 70 (12): 3411 - 3420.

- 112 - ———, ———, and M. A. Rezaian. 1989. Grapevine viroid 1B, A new member of the apple scar skin viroid group contains the left terminal region of tomato planta macho viroid. *Virology* 170 (2): 575 - 578.
- 113 - ———, ———, and ———, 1989. A scheme for viroid classification. *Intervirology* 30 (4): 194 - 201.
- 114 - Leitao, T., Duran-Vila, N. 1989. Detection of viroid RNAs in grapevine varieties from Portugal. *Mol. Cellular Bio* 14 (1-2) 29 - 39.
- 115 - Ma, X. *et al.* 1989. A small circular RNA from citrus plant. *Chin J. Virol* 5 (2) 140 - 144.
- 116 - McInnes, J. L., N. Habili and R. H. Symons. 1989. Nonradioactive, photobiotin-labelled DNA probes for routine diagnosis of viroids in plant extracts. *J. Virol Methods* 23 (3): 299 - 312.
- 117 - Meldraiz, Ya. A. *et al.* 1989. The use of synthetic oligodeoxyribonucleotide probe for the diagnosis of viroid diseases in potato and chrysanthemum. *Mol Biol (Mosco)* 23 : 816 - 821.
- 118 - Mozhaeva, K. A. *et al.* 1989. A comparative study of various diagnostic method of potato spindle shaped tuber viroid. *Biol Nauki (Mosco)* 0 (7): 104 - 110.
- 119 - Pallas, V. and R. Flores. 1989. Interactions between citrus exocortis and potato tuber spindle viroids in plants of *Gynura aurantiaca* and *Lycopersicon esculentum*. *Intervirology* 30 (1): 10 - 17.
- 120 - Puchta, H. and H. L. Saenger. 1989. Sequence analysis of minute amounts of viroid RNA using the polymerase chain reac

- tion. *Arch Virol.* 106 (3) 335 - 340.
- 121 - Rakowski, A. G. and R. H. Symons. 1989. Comparative sequence studies of variants of avocado sunblotch viroid. *Virology*. 173 (1): 352 - 356.
- 122 - Rivera - Bustamante, R. F. and J. S. Semancik. 1989. Properties of a viroid - replicating complex solubilized from nuclei. *J. Gen. Virol.* 70 (10) 2707 - 2716.
- 123 - Roy, B. P., M. G. Abuhaidar and A. Alexander. 1989. Biotinylated RNA probes for the detection of potato spindle tuber viroid. *J. Virol. Methods.* 23 (2): 149 - 156.
- 124 - Sano, T. *et al.* 1989. Hop Stunt Viroid strains from dapple fruit disease of plum and peach in Japan. *J. Gen. Virol.* 70 (6): 1311 - 1320.
- 125 - Schroeder, M. and H. L. Weidemann. 1989. Simplified application of return gel electrophoresis for the routine detection of potato spindle tuber viroid. *Bull Oepp.* 19 (4) 661 - 666.
- 126 - Singh, R. P. *et al.* 1989. Characteristics of cross-protection with potato spindle tuber viroid strains in tomato plants. *Can. J. Plant Pathol* 11 (3) 263 - 267.
- 127 - Tanimura, H. *et al.* 1989. chemical synthesis of the 24 RNA fragments corresponding to hop stunt viroid. *Nucleic Acids Res.* 17 (20): 8135 - 8148.
- 128 - Vera, P. and V. Conejero. 1989. The induction and accumulation of the pathogenesis-related P 69 proteinase in tomato during citrus exocortis viroid infection and in response to chemical treatments. *Physiol. Mol. Plant Pathol* 34 (4): 323 - 334.
- 129 - Vera, R., J. H. Yago and V. Conejero. 1989. Immunogold localiza-

- tion of the citrus exocortis viroid-induced pathogenesis - related proteinase P 69 in tomato leaves. *Bethesda* 91 (1): 119 - 123.
- 130 - Yang, G., D. Daming and Z. Yongzhi. 1989. Infection of *Gynura aurantiaca* leaf protoplasts with citrus exocortis viroid. *Chin J. Virol.* 5 (3): 277 - 279.
- 131 - Yang, G., Z. Y. Chen and D. Daming. 1989. Two kinds of circular RNA in *G. aurantiaca* cell infected with citrus exocortis viroid. *China J. Virol* 5 (11): 364 - 369.
- 132 - Yamaya, J. *et al.* 1989. Expression of hop stunt viroid from its complementary DNA in transgenic tobacco plants. *Mol Plant - Microbe Interact* 2 (4): 169 - 174.
- 133 - Zhang, H. *et al.* 1989. Detection of potato spindle tuber viroid with biotin-labelled PSTVd complementary DNA probe. *China J. Virol.* 5 (1): 72 - 76.

أبحاث سنة ١٩٨٨

- 134 - Branch, A. D. *et al.* 1988. Interference between coinoculated viroids. *Virology* 163 (2): 538 - 546.
- 135 - Branch, A. D., B. J. Benenfield and H. D. Robertson. 1988. Evidence for single rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 85 (23): 9128 - 9132.
- 136 - Candresse, T. *et al.* 1988. Detection of chrysanthemum stunt viroid using nick translated probes in a dot-blot hybridization assay. *J. Virol. Methods* 20 (3): 185 - 195.
- 137 - Chen, W., L. Lei, T. Po, P. Vos and R. Goldbach. 1988. Molecular cloning of complementary DNA of chrysanthemum stunt

- viroid. *Chin J. Virol* 4 (2): 173 - 175.
- 138 - Chen, W. *et al.* 1988. Grafting external healthy pear bud induces scar skin viroid in apple. *Chin J. Virol.* 4 (4): 367 - 370.
- 139 - Diener, T. O., D. R. Smith and M. Davino. 1988. Citrus B viroid identified as strain of hop stunt viroid. *Plant Dis.* 72 (8) 691 - 693.
- 140 - Duran - Vila, N. *et al.* 1988. A definition of citrus viroid groups and their relationship to the excocortis disease. *J. Gen Virol.* 69: 3069 - 3080.
- 141 - ———, ——— 1988. Production of viroid - free grapevines by Shoot tip culture. *Am. J. Vitic* 39 (3): 217 - 220.
- 142 - Keese, P., M. E. Osorio - Keese and R. H. Symons. 1988. Coconut tinangaja viroid: Sequence homology with coconut cadang - cadang viroid and other PSTVd related RNAs. *Virology* 162 (2): 508 - 510.
- 143 - Khoury, J. *et al.* 1988. Concentration and distribution of mild and severe strains of PSTV in cross-protection tomato plants. *Phytopathology.* 78 (10): 1331 - 1336.
- 144 - Koltunow, A. M. and M. A. Rezaian. 1988. Grapevine yellow speckle viroid. Structural features of a new viroid group. *Nucleic Acids Res.* 16 (3) 849 - 864.
- 145 - ———, ———, ——— and L. R. Krake. 1988. Hop stunt viroid and Australian grapevine cultivars. *Australians plant Pathol.* 17 (1): 7 - 10.
- 146 - Kryczynski, S. *et al.* 1988. Transmission of three viroids through seed and pollen of tomato plants. *J. Phytopath.* (BERL) 121 (1): 51 - 57.
- 147 - Ma, X. X. X. *et al.* 1988. An effective procedure for the separation

- and preparation of citrus exocortis viroid. *Virolsin* 3 (4): 370 - 375.
- 148 - Ohshima, K. *et al.* 1988. comparative studies on hostrange and the infectivity of hop stunt viroid cucumber isolate (cucumber pale fruit viroid) native RNA and its complementary DNA. *Arch Phytopathol Pflanzenschutz* 24 (6) 475 - 484.
- 149 - Puchta, H., K. Rumm and H. L. Saenger. 1988. The molecular structure of hop latent viroid, a new viroid occurring world wide in hops. *Nucleic Acids Res.* 16 (10): 4197 - 4216.
- 150 - Rezaian, M. A., A. M. Koltunow and L. R. Krake. 1988. Isolation of three viroids and a circular RNA from grapevines. *J. Gen virol.* 69 (2): 413 - 422.
- 151 - Sano, T. *et al.* 1988. Synthetic oligonucleotide hybridization probes to diagnose hop stunt viroid strains and citrus exocortis viroid. *J. Virol. Methods* 19 (2): 109 - 120.
- 151 - Semancik, J. S., C. N. Roistacher, R. and N. Duran - Vila. 1988. Citrus Cachexia viroid, a new viroid of citrus. Relationship to viroids of the exocortis disease complex. *J. Gen. Virol.* 69 (12): 3059 - 3068.
- 152 - Singh, R. P. and A. Boucher. 1988. Loss of potato spindle tuber viroid from tuber tissues after repeated freezing. *AM. Potato J.* 65 (5): 283 - 288.
- 153 - ———, and ——— and J. B. Seabrook. 1988. Detection of the mild strains of potato spindle tuber viroid from single true potato seed by return electrophoresis. *Phytopathol.*, 78 (6): 663 - 667.
- 154 - Xiong, C. *et al.* 1988. Growth properties of CEVd-infected *Gynura aurantiaca* cell suspension system. *Acta Micro Biol Sin* 28 (4): 361 - 366.

- 155 - Zhang, QI - YA, Z. GE and DA-Ming, Ding. 1988. Distribution of citrus exocortis viroid in different organs of *Gynura aurantiaca*. *Virol Sin* 3 (1): 71 - 76.
- 156 - ———, ———, ———1988. Could CEVd be removed by root propagation. *Chin J. Virol.* 4 (3): 275 - 276.

أبحاث سنة ١٩٨٧

- 157 - Bernardy, M. G., G. G. Jacoli and H. W. J. Ragetli. 1987. Rapid detection of potato spindle tuber viroid by dot blot-hybridization. *J. Phytopath* (BERL) 118 (2): 171 - 180.
- 158 - Bitters, W. P., N. Duran - Vila and J. S. Semancik. 1987. Effect of citrus exocortis viroid on flower and fruit structure and development on Etrog citron. *Plant Disease* 71 (5): 397 - 399.
- 159 - Granell, A., J. M. Belles and V. Conejero. 1987. Induction of pathogenesis - related protein in tomato by citrus exocortis viroid, silver ion and ethephon. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 31 (4): 83 - 90.
- 160 - Grasmick, M. E. and S. A. Slack. 1987. Detection of potato spindle tuber viroid in true potato seed by bioassay on Rutgers tomato. *AM. Potato J.* 64 (5): 236 - 244.
- 161 - Kryczynski, S. and E. Paduch - Cichal. 1987. A comparative study of four viroids. *J. Phytopathol.* (BERL) 120 (2): 121 - 129.
- 162 - Lopez - Herrera, C., F. Pliego and R. Flores. 1987. Detection of avocado Sunblotch viroid in Spain by double polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Phytopathol.* (BERL) 119 (2): 184 - 189.

- 163 - Morelli, L. T., P. E. Nelson and R. K. Horst. 1987. Histopathology of the Chrysanthemum cultivar Bonni Jean infected with Chrysanthemum Stunt Viroid. *Phytopathology* 77 (5): 655 - 660.
- 164 - Paduch - Cichal, E. and S. Kryczynski. 1987. A low temperature therapy and meristem - tip culture for eliminating four viroids from infected plants. *J. Phytopathol.* (BERL). 118 (4): 341 - 346.
- 165 - Pallas, V., A. Navarro and R. Flores. 1987. Isolation of a viroid - like RNA from hop different hop stunt viroid. *J. Gen Virol.* 68 (12) 3201 - 3206.
- 166 - Palukaitis, P. 1987. Potato spindle tuber viroid: Investigation of the longdistance, intraplant transport route. *Virology.* 158 (1): 239 - 241.
- 167 - ———, and M. Zaitlin. 1987. The nature and biological significance of linear potato spindle tuber viroid molecules. *Virology* 157 (1): 199 - 210.
- 168 - Pechan, R., H. Kuvert and H. J. Gross. 1987. Are small RNAs associated with Crohns' disease? *Z. Natur. Sect Bio Sci* 42 (7/8): 1000 - 1008.
- 169 - Schwinghamer, M. W. and P. Broadbent. 1987. Association of viroids with a graft-transmissible dwarfing symptoms in Australian orange trees. *Phytopath.* 77 (2): 205 - 209.
- 170 - ———, ———, ——— 1987. Detection of viroids in dwarfed orange trees by transmission to chrysanthemum. *Phytopathol.* 77 (2): 210 - 215.
- 171 - Semancik, J. S., R. Rivera - Bustamante and A. C. Goheen. 1987. Widespread occurrence of viroid-like RNA species in grapevines. *AM. J. ENOL VITIC* 38 (1): 35 - 40.

- 172 - Singh, R. P. and A. Boucher. 1987. Electrophoretic separation of a severe from mild strains of potato spindle tuber viroid. *Phytopathol.* 77 (11): 1588 - 1590.
- 173 - Tsagris, M., M. Tabler and H. L. Saenger. 1987. Oligomeric potato spindle tuber viroid RNA does not process autocatalytically under conditions where other RNA species do. *Virology* 152 (1): 227 - 231.
- 174 - Weidemann, H. L. 1987. The distribution of potato spindle tuber viroid in potato plants and tubers. *Bull OEPP* 17 (1): 45 - 50.
- 175 - Zhou, Y. C. and D. Daming. 1987. A preliminary study on the cultivation of citrus exocortis viroid in the tissue culture of *Gynura aurantiaca*. *Chin J. Virol* 3 (3): 277 - 281.

أبحاث سنة ١٩٨٦

- 176 - Belles, J. M. et al. 1986. Antiviroid effects of ribavirin of citrus exocortis viroid infection in *Gynura aurantiaca*. *Physiol Mol Plant Pathol* 28 (1): 61 - 66.
- 177 - Conejero, V. and A. Granell. 1986. Stimulation of a viroid - like syndrome and the impairment of viroid infection *Gynura aurantiaca* plants by treatment with silver ions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 29 (3): 317 - 324.
- 178 - Diener, T. O. 1986. Viroid processing: A model involving the central conserved region and hairpin I. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 (1): 58 - 62.
- 179 - Dinter, G. G. 1986. Viroids and virusoids are related to group I introns. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 (17) 6250 - 6254.
- 180 - Duran - Vila, N., R. Flores and J. S. Semancik. 1986. Characteriza-

- tion of viroid - like RNA associated with the citrus exocortis Syndrome. *Virology* 150 (1): 75 - 84.
- 181 - Flores, R. 1986. Detection of citrus exocortis viroid in crude extracts by dot-blot hybridization. *J. Virol Methods* 13 (2): 161 - 170.
- 182 - Grasmick, M. E. and S. A. Slack. 1986. Effect of potato spindle tuber viroid on sexual reproduction and viroid transmission in the true potato seed. *Can. J. Bot.* 64 (2) 336 - 340.
- 183 - Orozco, V. G. and J. G. Alonso. 1986. Ecology of tomato plant macho viroid. *Rev. Mex Fitopathol* 4 (1): 19 - 28.
- 183 - Rivera - Bustamante, R. F., R. Gin and J. S. Semancik. 1986. Enhanced resolution of circular and linear molecular forms of viroid and viroid - like RNA by electrophoresis in a discontinuous pH system. *Annl Biochem* 156 (1): 91 - 95.
- 184 - Schumacher, J., *et al.* 1986. Diagnostic procedure for detection of viroid and viruses with circular DNA by return - gel electrophoresis. *J. Phytopathol.* (Berl) 115 (4): 332 - 343.
- 185 - Sano, T. *et al.* 1986. A viroid resembling hop stunt viroid in grapevines from Europe, the USA and Japan. *J. Gen Virol* 67 (8): 1673 - 1678.
- 186 - Schwinghamer, M. W. and G. R. Scott. 1986. Survey of New South Wales potato crops for PSTVd. *Plant Dis.* 70 (8) 774 - 776.
- 187 - Semancik, J. S. 1986. Separation of viroid RNA by cellulose chromatography indicating conformational distinctions. *Virol.* 155 91): 39 - 45.
- 188 - Singh, R. P., D. Levesque and R. R. King. 1986. A rapid procedure for the purification of PSTV. *Can J. Plant Pathol.* 8 (1) 54 - 58.

- 189 - Visvader, J. E. and R. H. Symon. 1986. Replication of *in vitro* constructed viroid mutants. *Embo J.* 5 (9): 2051 - 2056.
- 190 - Wang, M. C. et al. 1986. Alternation in cell wall composition and structure in viroid - infected cells. *Physiol Mol. Plant Pathol.* 28 (1): 107 - 124.
- 191 - Yoshikawa, N. and T. Takahashi. 1986. Inhibition of hop stunt viroid replication by α -amanitin. *Z. Pflanzenkr Pflanze Nschutz* 93 (1): 62 - 71.
- 192 - Zhang, Q. Y. et al. 1986. Synthesis of CEVd and CSVd and detection by the probes. *Virol Sin* 1 (4): 93 - 98.

أبحاث سنة ١٩٨٥

- 193 - Bar - Joseph, M., et al. 1985. Detection of avocado sunblotch viroid by hybridization with synthetic oligonucleotide probes. *J. Virol Methods* 10 (1) 69 - 74.
- 194 - Barker, J. M. et al. 1985. Dot-blot procedure with phosphorus-32 DNA probes for the sensitive detection of avocado sunblotch and other viroids in plants. *J. Virol Methods* 10 (2): 87 - 98.
- 195 - Flores, R. et al. 1985 - Detection of viroid and viroid - like RNA species from grapevine. *J. Gen Virol.* 66 (10): 2095 - 2102.
- 196 - Grasmick, M. E. and S. A. Slack. 1985. Symptom expression enhanced and low concentrations of Potato spindle tuber viroid amplified in tomato with high light intensity and temperature. *Plant Dis.*, 69 (1): 49 - 51.
- 197 - Imperial, J. S., R. M. Bautista and J. W. Randles. 1985. Transmission of the coconut cadang - cadang viroid to six species of palm by inoculation with nucleic acid extracts. *Plant Pathol* (London) 34 (3): 391 - 401.

- 198 - Kano, T. and A. Yamaguchi. 1985. Indexing for citrus exocortis viroid using herbaceous plants. *Bull Fruit Tree Str Ser B* 12 (95 - 108).
- 199 - Keese, P. and R. H. Symons. 1985. Domains in viroids. Evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 82 (14): 4582 - 4586.
- 200 - Koganezawa, H. 1985. Transmission to apple seedlings of a low molecular weight RNA extracted from apple scar skin disease trees. *Ann. Phytopathol. Soc. JPN.* 51 (2): 176 - 182.
- 201 - Meshi, T. *et al.* 1985. The sequence necessary for the infectivity of hop stunt viroid complementary DNA clones. *Mol Gen Genet.* 200 (2): 199 - 206.
- 202 - Mohamed, N. A. *et al.* 1985. Purification and infectivity of the coconut cadang - cadang viroid. *Phytopathology*, 75 (1): 79 - 83.
- 203 - Sano, T. *et al.* 1985. A viroid - like RNA isolated from grapevine has high sequence homology with hop stunt viroid. *J. Gen Virol* 66 (2): 333 - 338.
- 204 - Schnoelzer, M. *et al.* 1985. Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid. *EMBO J.* 4 (9): 2181 - 2190.
- 205 - Singh, R. P. and C. F. Crowley. 1985. Successful management of potato spindle tuber viroid in seed potato crop. *Can. Plant dis Surv* 65 (1): 9 - 10.
- 206 - Takahashi, T. *et al.* 1985. Some characteristics in cytopathic changes induced by viroid infection. *J. Fac. Agric Iwate Univ.* 17 (3): 267 - 280.

- 207 - ———, ——— and S. Yaguchi. 1985. Strategies for preventing mechanical transmission of hop stunt viroid. Chemical and heat inactivation on contaminated tools. *Z. Pflanzenerkrankung Pflanzenschutz* 92 (2): 132 - 137.
- 208 - Yoshizaki, T. *et al.* 1985. The effects of some chemical on the infectivity of cucumber isolate of hop stunt viroid. *Ann Phytopathol Soc. JPN* 51 (4): 405 - 412.
- 209 - Yaguchi, S. and T. Takahashi. 1985. Syndrome characteristics and endogenous IAA levels in cucumber plants incited by hop stunt viroid. *Z. Pflanzenerkrankung P.* 92 (3): 263 - 269.

أبحاث سنة ١٩٨٤

- 210 - Boiko, A. L., G. S. Litvinov and S. A. Romasher. 1984. Viroid causing stunt deformity of hop plants in biocenoses of the Ukrainian SSR. *D. A. N. U. S. S. B. G. K. B. N.* 0 (11): 62 - 65.
- 211 - DA GRACA, J. V. and T. E. Mason. 1984. Detection of avocado sunblotch viroid in flower buds by polyacrylamide gel electrophoresis. *Phytopathol., Z.* 108 (3/4) : 262 - 266.
- 212 - Flores, R. 1984. Is the conformation of viroids involved in their pathogenicity. *J. Theor Biol* 108 (4): 519 - 528.
- 213 - Momma, T. and T. Takahashi. 1984. Development morphology of hop stunt - viroid infected hop plants and analysis of their cone yield. *Phytopatho. Z.* 110 91): 1 - 14.
- 214 - Mohamed, N. R. and J. S. Imperial. 1984. Detection and concentration of coconut cadang - cadang viroid in coconut leaf extracts. *Phytopathology* 74 (2): 164 - 169.

- 215 - Perez, R. *et al.* 1984. Exocortis viroid presence in clementine Mandarin grafted on Troyer. *Cent Agric* 11 (3): 65 - 72.
- 216 - Spiegel, S., M. Alper and R. N. Allen. 1984. Evaluation of biochemical methods for the diagnosis of the avocado sunblotch viroid in Israel. *Phytoparasitica* 12 (1): 37 - 44.
- 217 - Sano, T., I. Uyeda and E. Shikata. 1984. Comparative studies of hop stunt viroid and cucumber pale fruit viroid. *Ann. Phytopathol Soc. JPN* 50 (3): 339 - 345.
- 218 - Schumacher, J., J. W. Randles and D. Riesner. 1984. A 2 - dimensional electrophoretic technique for the detection of circular viroids and virusoids. *Annl Biochem.* 135 (2) : 288 - 295.
- 219 - Semancik, J. S. and Judy, Z. 1984. Enhanced detection of viroid - RNA after selective divalent cation fractionation. *Ann. Biochem.*, 135 (2): 275 - 279.
- 220 - Steger, G. *et al.* 1984. conformational transitions in viroids and virusoids *J. Biomol Struct Dyn* 2 (3): 543 - 572.
- 221 - Tabler, M. and H. Saenger. 1984. Cloned single - stranded and double - stranded DNA copies of PSTV RNA and co-inoculated subgenomic DNA fragments are infectious. *Eur Mol Biol Organ J.* 3 (13): 3055 - 3062.
- 222 - Uyeda, I., T. Sano and E. Shikata. 1984. Purification of cucumber pale fruit viroid. *Rnn. Phytopathol. soc. JPN.* 50 : 331 - 338.
- 223 - Vasileva, T. Y. and K. A. Mozhaeva. 1984. Resistance of PSTVd to certain physical factors. *Biol Nauki (Mosco)* 0 (3): 15 - 21.

- 224 - Watermeyer, S. R. 1984. Detection of chrysanthemum stunt viroid in South Africa by PAGE and bioassay. *Plant Dis.* 68 (6): 485 - 488.
- 225 - Yaguchi, S. and T. Takahashi. 1984. Response of cucumber cultivars and other cucurbitaceous species to infection by hop stunt viroid. *Phytopathol. Z.* 109 (1) : 21 - 31.
- 226 - ———, and ——— 1984. Survival of hop stunt viroid in the hop garden. *Phytopathol. Z.* 109 (1) 32 - 44.

أبحاث سنة ١٩٨٣

- 227 - Deloire, A., P. Mampouga and J. Robert. 1983. Studies of an incompatibility to grafting, produced in 2 species of citrus, with the aid of *in vitro* micrografts due to the presence in the scion of exocortis viroid. *Cr Seances Acad Sci Ser III Sci Vie* 297 (13) 621 - 626.
- 228 - Kieft, M. C., R. A. Owens and T. O. Diener. 1983. Structural similarities between viroids and transposable genetic elements. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 80 (20) 6234 - 6238.
- 229 - Larosa, A. *et al.* 1983. Chrysanthemum stunt viroid in Italy. *Riv. Patho Veg* 19 (2): 77 - 84.
- 230 - Momma, T. and T. Takahashi. 1983. Cytopathology of shoot apical meristem of hop plants infected with hop stunt viroid. *Phytopathol. Z.* 106 (3) : 272 - 280.
- 231 - Muehlbach, H., O. Faustmann and H. L. Saenger. 1983. Conditions for optimal growth of PSTVd infected potato cell suspension and detection of viroid - complementary longer - than - unit - length RNA in these cells. *Plant Mol Biol* 2 (5): 239 - 248.

- 232 - Riesner, D. M. *et al.* 1983. Dynamics and interactions of viroids. *J. Biomol Struct Dyn* 1 (3) 669 - 688.
- 233 - Rosner, A. S., M. Alper and M. Bar Joseph. 1983. Detection of avocado sunblotch viroid - *Plant Mol. biol* 2 (1): 15 - 18.
- 234 - Schumacher, J., H. L. Saenger and D. Riesner. 1983. Subcellular localization of viroids in highly purified nucleic acid from tomato leaf tissue. *EMBO J.* 2 (9): 1549 - 1556.
- 235 - Spiesmacher, E. *et al.* 1983. Oligomeric forms of PSTVd and of its complementary RNA *Bio Sci Rep* 3 (8): 767 - 774.
- 236 - Takahashi, T., M. Takada and N. Yoshikawa. 1983. Comparative indexing of hop plants for hop stunt viroid infection. *J. Fac. Agri Iwate Univ.* 16 (3): 141 - 150.

أبحاث سنة ١٩٨٢

- 237 - Branch, A. *et al.* 1982. Cell-Free circularization of viroid progeny RNA by an RNA ligase from wheat germ. *Science* 217 : 1147 - 1149.
- 238 - Flores, R. and J. S. Semancik. 1982. Properties of a cell-free system for synthesis of citrus exocortis viroid. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 79 (20): 6285 - 6288.
- 239 - Galindo, A., J. D. R. Smith and T. O. Diener. 1982. Etiology of Planta Macho avirid disease of tomato. *Phytopathol.* 72 (1) 49 - 54.
- 240 - Gross, H. J. *et al.* 1982. Nucleotide sequence and secondary structure of CBVd and CSVd. *Eur J. Biochem.* 121 (2): 249 - 258.
- 241 - Haseloff, J. *et al.* 1982. Viroid RNA of cadang - cadang disease of coconut. *Nature (London)* 229 (2881). 316 - 321.

- 242 - Momma, T. and T. Takahashi. 1982. Ultrastructural of hop stunt viroid - infected leaf tissue. *Phytopath. Z.* 104 (3): 211 - 221.
- 243 - Mohammed A. R. *et al.* 1982. Characterization of the different electrophoretic forms of the cadang - cadang Viroid. *J. Gen. Virol.* 63 (1): 181 - 188.
- 244 - Mosch, W. H. *et al.* 1982. Development of a standered method for detection of PSTVd in potato plants. *NETH J PLANT PATHOL.* 88 (3): 113 - 122.
- 245 - Naddi, Z. E. *et al.* 1982. Studies of the viroid of exocortis diseases in citrus plants. *Izv. Timiryazen S-KH AKAD O* (4): 187 - 189.
- 246 - Ohno, T. *et al.* 1982. purification and characterization of hop stunt viroid. *Virology.* 118 (1): 54 - 63.
- 247 - Owens, R. A and T. O. Diener. 1982. RNA intermediates in PSTVd replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 79 (1): 113 - 117.
- 248 - Rohde, W. 1982. Affinity chromatography of viroid RNA. *Arch Virol* 71 (2): 169 - 176.
- 249 - Yoshikawa, N. and T. Takahashi. 1982. Purification of hop stunt viroid. *Ann Phytopathol Soc. JPN* 48 (2): 182 - 191.
- 250 - Zelcer, A. *et al.* 1982. PSTVd infected tissues contain RNA complementary to the entire viroid. *J Gen Virol* 59 (1): 139 - 148.
- 251 - Zelazny, B. and E. Pacumbaba. 1982. Incidence of cadang - cadang disease of coconut palm in Philippines. *Plant Dis* 66 (7): 547 - 549.

أبحاث سنة ١٩٨١

- 252 - Boccardo, G. *et al.* 1981. Tinangaja and bristle top coconut disease of uncertain etiology in Guam. *Phytopathology* 71 (10): 1104 - 1107.

- 253 - DA GRACA, J. V. and M. M. Martin. 1981. Ultrastructural changes in avocado leaf tissue infected with avocado sunblotch viroid. *Phytopathol Z* 102 (3/4): 185 - 194.
- 254 - Diener, T. O. 1981. Viroids: Minimal biological system: *Biosciences* 31 (1): 38 - 44.
- 255 - Dickson, E. 1981. A model for the involvement of viroids in RNA splicing. *Virology* 115 (1): 216 - 221.
- 256 - Klotz, G. and H. L. Saenger. 1981. Electron microscopic evidence for viroid conformers. *Eur J. Cell Biol.* 25 (1): 5 - 7.
- 257 - Imperial, J. *et al.* 1981. Variation in the viroid - like RNA associated with cadang - cadang disease. *J. Gen Virol.* 56 (1): 77 - 86.
- 258 - Owens, R. and T. O. Diener. 1981. Sensitive and rapid diagnosis of PSTVd disease by nucleic acid hybridization. *Science* (Wash - Dc) 213 (4508) : 670 - 672.
- 259 - Palukaitis, P. *et al.* 1981. Rapid indexing of the sunblotch disease of avocado using a complementary DNA probe to avocado sunblotch viroid. *Ann Appl Biol:* 98 (3): 439 - 450.
- 260 - Sano, T., M. Sasaki and E. Shikata. 1981. Comparative studies on hop stunt viroid, cucumber pale fruit viroid and PSTVd. *Ann. Phytopathol. Soc. JAP.* 47 (5) 599 - 605.
- 261 - Walter, B. 1981. A viroid on tomato in west Africa. Identity with PSTVd. *CR Seances Acad Sci Ser III Sci* 292 (8): 537 - 542.

أبحاث سنة ١٩٨٠ وما قبلها

- 262 - Hari, V. 1980. Ultrastructure of potato spindle tuber viroid-infected tomato leaf tissue. *Phytopathology.* 70 (5): 385 - 387.

- 263 - Harris, P. S. and I. A. Browning. 1980. The effects of temperature and light on the symptom expression and viroid concentration in tomato of a severe strain of PSTVd. *Potato Res.* 23 (1): 85 - 94.
- 264 - Mohamed, N. A. and W. Tomas. 1980. Viroid - like properties of an RNA species associated with the sunblotch disease of avocado. *J. Gen Virol.* 46 : 157 - 168.
- 265 - Palukaitis, P. and R. H. Symons. 1980. Purification and characterization of the circular and linear forms of chrysanthemum stunt viroid. *J. Gen Virol* 46 (2) 477 - 490.
- 266 - Semancik, J. S. and P. R. Desjardins. 1980. Multiple small RNA species and the viroid hypothesis for the sunblotch disease of avocado. *Virology.* 104 (1): 117 - 121.
- 267 - Silvergate, A. F. et al. 1980. Reduction of pith maceration by *Erwinia chrysanthemi* in chrysanthemum cuttings infected with CSVd. *Phytopathol.* 70 (2): 135 - 139.
- 268 - Takahashi, T. and H. Takusari. 1980. Some factors affecting mechanical transmission of hop stunt disease agent. *Phytopathol. Z.* 96 (4): 352 - 360.
- 269 - Velasco, J. R., A. S. Lansangan and E. Canapi. 1980. Island, Philippines: observations on coconut cadang - cadang. *Philipp. J coconut Stud.* 5 (1): 11 - 16.
- 270 - Wahn, K. F. and H. L. Saenger. 1980. Cytopathic changes in leaf tissue of *Gynura aurantiacae* infected with the viroid of citrus exocortis. *J. Gen Virol* 49 (2): 355 - 366.
- 271 - Palukaitis, P. et al. 1979. characterization of a viroid associated with avocado sunblotch disease. *Virology* 99 (1) : 145 - 151.

- 272 - ———, ——— 1979. Hybridization analysis of chrysanthemum stunt viroid with complementary DNA and the quantitation of viroid RNA sequences in extracts of infected plants *Virology* 98 (1): 238 - 245.
- 273 - Riesner, D. *et al.* 1979. Structure and structure formation of viroids. *J. Mol Biol.* 133 (1) 85 - 116.
- 274 - Niblett, C. L. *et al.* 1978. Cross protection among four viroids. *Virology* 91 (1): 198 - 203.
- 275 - Sasaki, M. and E. Shikata. 1978. Studies on hop stunt disease : 2 properties of the causal agent, a viroid. *Rep Res Lab Kirin Brew Co LTD.* 0 (21): 41 - 48.
- 276 - ——— ——— 1978. Studies on hop stunt disease : 2 properties of a viroid. *Ann Phytopathol Soc. JPN.* 44 (5): 570 - 577.
- 277 - Schumann, G. L. *et al.* 1978. Comparison of tomato bioassay and slab gel electrophoresis for detection of PSTVd in potato. *Phytopathol.* 68 (9): 1256 - 1259.
- 278 - Semancik, J. S., L. K. Grill and E. L. Civerolo. 1978. Accumulation of viroid RNA in tumor cell after double infection by *A. tumefaciens* and citrus exocortis viroid. *Phytopath.* 68 (9): 1288 - 1292.
- 279 - Singh, R. P. and R. E. Williams. 1978. PSTVd: Circular dichroism spectrum and physical chemical studies of its interaction with ethidium bromide. *Can J. Biochem* 56 (10) : 934 - 938.

رقم الإيداع
١٩٩٦ / ٥٥٧٥

عمومية للطباعة والنشر
١٠٠٧ شارع السلام - أرض اللواء الهندسين
تليفون : ٣٠٣١٠٤٣ - ٣٠٣٦٠٩٨

VIROID

AND VIROID DISEASES

DR. M. M. ABU-ARKOUB

هذا الكتاب

قبل أن نتكلم عن هذا الكتاب يجب أن نقول سبحانه الله وصدق اذ يقول « سنريهم آياتنا في الآفاق » إن الفيرويد من دلائل القدرة المطلقة لله سبحانه وتعالى ، ولا يستطيع المتخصص أن يدرك ذلك إلا إذا تحيل طول هذا السبب وصفاته بالمقارنة مع الفيروس الذى هو أصغر مسبب مرضى قد عرف سابقاً . لقد وضع هذا الكتاب في عيد الميلاد الفضى لاكتشاف وتسمية الفيرويد ، وبالرغم من العمر القصير لهذا العلم إلا أنه تقدم بخطوات سريعة جداً في ظل التكنولوجيا العلمية الحديثة .

يعتبر هذا الكتاب الأول من نوعه الذى يخوض في هذا المجال وإن كان قد سبقه نشرتين صغيرتين سنة ١٩٧٨ ، ١٩٨٢ في كاليفورنيا عندما كانت الأمراض الفيرويدية لا تزيد عن سبعة أمراض أما الآن فهي بضع وثلاثون . قبل أن يبدأ القارئ الكريم تقليب صفحات هذا الكتاب نذكر تعريف الفيرويد ونقول إن الفيرويدات هى جزيئات من RNA معدية ذات وزن جزيئى منخفض أحادية الخيط تكون دوائر مغلفة ذات درجة عالية من تزاوج القواعد الداخلية وفيها مقاطع عديدة من القواعد المتكاملة والتي تشكل روابط هيدروجينية عبر الجزئ . جاعلة الدوائر تنطوى وتعطى شكل ثنائى الخيط إلى حد ما . ولئن نتكلم عن محتويات الكتاب في هذا التخريج لأن ذلك مذكوراً في المقدمة .

يسر الناشر أن يقدم هذا الكتاب بأنه أول لبنة توضع في صرح علم الفيرويد للقارئ العربى والذي يكون مفيداً لكل مهتم أو متخصص في مجال العلوم البيولوجية الحديثة وهو أكثر فائدة وأهمية لاختصاصى علم الهندسة الوراثية والكيمياء الحيوية الجزيئية وأمراض النبات حيث أن ولوجهم هذا الصرح يزيد إلى أنهار معارفهم جداول أخرى .

وبالله التوفيق

الناشر
أحمد أمين

ISBN : 977 - 281 - 020 - 4



ACADEMIC BOOKSHOP

